

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
ELÉTRICA**

**José Alvim Berkenbrock**

**ELETROQUIMIOTERAPIA NO TRATAMENTO DE CÂNCER:  
CAMPOS ELÉTRICOS, ELETRODOS E MODELOS DE  
TECIDOS (*EX VIVO*, *IN VIVO* E *IN SILICO*)**

Florianópolis  
2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
ELÉTRICA**

**ELETROQUIMIOTERAPIA NO TRATAMENTO DE CÂNCER:  
CAMPOS ELÉTRICOS, ELETRODOS E MODELOS DE  
TECIDOS (*EX VIVO*, *IN VIVO* E *IN SILICO*)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Elétrica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Daniela Ota Hisayasu Suzuki,  
Dr<sup>a</sup>. Eng<sup>a</sup>.

Florianópolis  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pela autora através do  
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC

A ficha de identificação é elaborada pelo próprio autor

Maiores informações em:  
<http://portalbu.ufsc.br/ficha>

**José Alvim Berkenbrock**

**ELETROQUIMIOTERAPIA NO TRATAMENTO DE CÂNCER:  
CAMPOS ELÉTRICOS, ELETRODOS E MODELOS DE  
TECIDOS (*EX VIVO*, *IN VIVO* E *IN SILICO*)**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Elétrica, Área de Concentração Engenharia Biomédica, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 12 de julho de 2016

---

Prof. Carlos Galup Montoro, Dr.  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica

**Banca Examinadora:**

---

Prof<sup>a</sup>. Daniela Ota Hisayasu Suzuki, Dr<sup>a</sup>. Eng<sup>a</sup>.  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina.

---

Prof. José Marino Neto, Dr.Sc.  
Universidade Federal de Santa Catarina.



**Banca Examinadora (continuação):**

---

Prof. Pedro Giassi Júnior, Dr.  
Instituto Federal de Santa Catarina

---

Veterinário Marcelo Monte Mór Rangel, Dr.  
Vet Câncer, São Paulo – SP

---

Prof. Mauricio Valência Ferreira Da Luz, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina





## **DEDICATÓRIA**

A meu avô José,  
Eterno exemplo de dedicação



## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Professora Daniela Ota Hisayasu Suzuki. Por todos os conselhos acadêmicos e de vida, pela oportunidade e confiança. Desde o início como aluno de iniciação científica em 2010, a Professora Suzuki foi tutora não apenas no estudo da eletroporação, mas ensinou-me muito sobre o processo acadêmico e método científico.

Ao Instituto de Engenharia Biomédica, professores e colegas. Nesta relação de seis anos, pude conhecer muitos dos pesquisadores formados pelo Instituto. Tive a oportunidade assistir e me motivar com aulas e palestras de cientistas, os quais, indubitavelmente, são parte essencial de minha formação.

À Universidade Federal de Santa Catarina, por ter me acolhido desde os anos da graduação. Um expoente da ciência nacional, centro de ensino de alta qualidade e um ambiente plural, livre e vibrante. Muito além de ter me formado com engenheiro eletricista, esta Universidade me permitiu uma formação como cidadão.

Aos órgãos de fomento a pesquisa, CNPq e CAPES, pela bolsa de estudos desde o início do mestrado. E no que diz respeito ao financiamento da pesquisa brasileira, não poderia deixar de estender o agradecimento a toda nossa população, que talvez meio sem entender o que fazemos, é nossa grande patrocinadora.

Finalmente, o mais profundo agradecimento à minha família. Aos meus pais, Arno e Rita, ao meu irmão, Jeferson, e aos meus avós, José, Luci e Terezinha, e a minha noiva, Rafaela. Agradeço pelo apoio incondicional, pelas palavras de motivação, pela fé depositada em mim, pela vibração de cada conquista e pelo abraço forte depois de um tropeço. Por me ouvirem falar de coisas invisíveis e acreditarem que era verdade, mais ainda, por me ouvirem tentando explicar novamente, de outra maneira, aquelas mesmas coisas invisíveis. As palavras paternas “filho, as pessoas podem tirar de ti tudo o que possuíres, menos aquilo que tiveres na mente. E com isso, poderás sempre recomeçar”.

A todos vocês,  
Muito Obrigado!



*“We gotta do much more than believe  
If we really wanna change things  
We gotta do much more than believe  
If we wanna see the world change”*

David J. Matthews



## RESUMO

A eletroquimioterapia (EQT) é um tratamento contra o câncer baseado na ação conjunta entre drogas quimioterápicas e campos elétricos intensos sobre o tecido. Um tratamento por EQT tem sua efetividade dependente da completa cobertura do tecido alvo por um campo elétrico suficientemente alto. Um campo elétrico demasiadamente intenso produz instabilidade celular e necrose. O objetivo do capítulo I deste trabalho foi avaliar a utilização de eletrodos de agulhas no tratamento de EQT para tumores cutâneos superficiais. Foram estudadas perdas de efetividade do tratamento em função da relação entre as dimensões do tumor e dos eletrodos. Experimentos *in silico* foram realizados variando tipos de eletrodos, polarização das agulhas e dimensões do tumor. As comparações foram realizadas entre os valores de tensão mínima necessária para a efetividade do tratamento. Nódulos elevados são casos em que a EQT pode não ser efetiva. Utilizando o eletrodo do estudo de caso, os resultados também mostram que um nódulo só seria tratável se sua altura (acima da pele) não fosse superior a 4,38 mm. Os eletrodos hexagonais não são uma boa opção para o tratamento de tumores elipsoidais, a menos que seja inserida uma agulha central no eletrodo. Para polarização estática, eletrodos de matriz não tem capacidade de cobrir todo volume tumoral com uma única aplicação. Das variações realizadas no eletrodo de agulhas paralelas, reduzir a distância entre agulha na mesma linha resultou na maior redução da tensão mínima, todavia, para realizar uma única aplicação, foi necessário eletrodo com 15 pares de agulhas. Para o nódulo estudado, os resultados mostram que se deve preservar distância entre nódulo e agulhas, diferentemente do caso com eletrodos de placas. No capítulo II, o objetivo geral foi obter um modelo numérico para a eletroporação em tecido de mucosa oral. Foram realizados experimentos com amostras *ex vivo* de mucosa oral de murinos, modelagem numérica da eletroporação do tecido e comparação com resultados *in vivo*. Os valores de condutividade elétrica da mucosa são compatíveis com certos tecidos biológicos. A aplicação do modelo demonstra que a anatomia da cavidade oral provoca irregularidades na distribuição de campo. Esse efeito ocorre, principalmente, próximo a ossos e ao palato duro.

**Palavras-chave:** eletropermeabilização. eletroporação. bioimpedância elétrica. tecidos biológicos. pele. mucosa oral. modelo numérico. método de elementos finitos. COMSOL Multiphysics.





## ABSTRACT

*Electrochemotherapy (ECT) is a cancer treatment based on joint action between chemotherapy drugs and intense electric fields on the tissue. An ECT treatment has its effectiveness dependent of complete coverage of the target tissue with a high enough electric field. A very intense electric field produces cellular instability and necrosis. The purpose of Chapter I of this study was to evaluate the use of needle electrodes in the treatment of ECT for superficial skin tumors. It was studied the loss of effectiveness of the treatment by the ratio between the size of the tumor and of the electrodes. In silico experiments were carried out varying types of electrodes, polarization of the needles and the tumor dimensions. Comparisons were made between the minimum voltage required values for the effectiveness of treatment. High nodules are cases where ECT may not be effective. Using the electrode of the case study, the results also show that a nodule was only treatable if its height (above the skin) was not more than 4.38 mm (0.17 inches). Hexagonal electrodes are not a good option for the treatment of ellipsoidal tumors, unless a central needle in the electrode is inserted. For static polarization array of electrodes is unable to cover the entire tumor volume with a single application. Among all variations made in electrode of parallel needles, to reduce the distance between the needles on the same line resulted in the largest reduction of the minimum voltage, however, to make a single application, it has been necessary an electrode with 15 pairs of needles. For the studied nodule, the results show that a distance between node and needles must be preserved, unlike the case with plate electrodes. In Chapter II, the overall objective was to obtain a numerical model for electroporation in tissue oral mucosa. Experiments were carried out with ex vivo samples of oral mucosa of mice, numerical modeling of tissue electroporation and comparison with in vivo results. The mucosal electric conductivity values are compatible with other biological tissues. The application of the model shows that the anatomy of the oral cavity causes irregularities in the electric field distribution. This effect occurs mainly near the bone and hard palate.*

*Key-words: electroporation. electrical bioimpedance. biological tissues. skin. oral mucosa. numerical model. finite element method. COMSOL Multiphysics.*



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Esquema representativo do surgimento de um nódulo tumoral a partir da morte de uma célula num tecido saudável. Num tecido saudável (1) se desenvolve um processo de morte celular (2), que em virtude de algum fator mutagênico inicia um processo de multiplicação destas células contendo a mutação (representadas pelo formato estrelado, em 5 e 6). A massa de células mutadas se espalha pelo tecido formando alterações macroscópicas no mesmo..... 36
- Figura 2 - Esquema das etapas da eletroquimioterapia em tumor cutâneo. Acima, uma visão macroscópica do procedimento de aplicação da EQT. Embaixo, é apresentado o comportamento das moléculas do quimioterápico sendo injetadas no tumor, e em seguida, inseridas nas células tumorais durante a aplicação do pulso elétrico ..... 41
- Figura 3 - Relação entre intensidade e comprimento do campo elétrico aplicado para eletroporação. Fonte: (WEAVER *et al.*, 2012) ... 42
- Figura 4 - Eletroporação em nível da célula (acima) e da membrana plasmática (abaixo). O painel superior apresenta um conjunto de células antes e durante a eletroporação, no canto direito, visões da face próxima ao ânodo (frente) e ao cátodo (fundo). A diferença no tamanho e número dos poros nos polos da célula representam resultados experimentais que demonstram haver maior entrada de marcadores fluorescentes no ânodo (GABRIEL; TEISSIÉ, 1997) e (PAGANIN-GIOANNI *et al.*, 2011). No painel inferior são mostradas a formação ao fechamento do poro na bicamada lipídica da membrana pela aplicação de pulso de tensão ..... 48
- Figura 5 - Modelos geométricos com malha gerada para definição dos domínios de cálculo. (A) Modelo considerando tratamento por eletrodos de placas paralelas. (B) Estudo de caso, com aplicação dos pulsos através de eletrodo de agulhas (tipo II). Não há necessidade de executar cálculos de campo elétrico nos eletrodos de metal (*e.g.* cobre, aço inox), ocasionando redução do esforço computacional..... 56
- Figura 6 - Gráfico da condutividade em função do campo elétrico para diferentes tecidos biológicos. .... 58
- Figura 7 - Estudos de casos veterinários. Nódulos de carcinoma de células escamosas (A) antes e (B) 9 meses após o tratamento por

EQT. Melanoma oral (C) antes e (D) 33 dias após tratamento por EQT.....	61
Figura 8 - Modelo geométrico com eletrodo de placas. ....	62
Figura 9 - Modelo geométrico com eletrodo de agulhas paralelas.....	63
Figura 10 - Modelo geométrico de câncer oral e eletrodos. (A) Modelo 3D do tumor em simulação. A partir dos cortes YZ e XY são analisadas as distribuições de campo elétrico. A esfera sólida representa o tumor, e está envolvida pela camada de mucosa oral. (B) Dimensões e descrições dos tecidos. FONTE: (Suzuki <i>et al</i> , 2016b).....	64
Figura 11 - Exemplo de visualização do resultado. À esquerda a geometria tridimensional. À direita três fatias dos planos ZX, XY e YZ. As setas tracejadas indicam o local de onde são retiradas as fatias. A escala representa a intensidade de campo elétrico local. .....	66
Figura 12 - Distribuição de campo elétrico em modelo de pele. (A) Simulação de aplicação por placas. (B) Legenda de tons para diferentes intensidades de campo elétrico local. Em preto representa região de tecido onde não ocorre eletroporação; área em branco representa região de eletroporação irreversível; em cinza significa ocorrência de eletroporação reversível. As cores não representam variações reais da pigmentação dos tecidos. ...	67
Figura 13 - Determinação do potencial elétrico mínimo necessário a ser aplicado durante o tratamento para que o tumor esteja completamente imerso em campo elétrico superior ao limiar de eletroporação. ....	68
Figura 14 - Simulação do estudo de caso .....	69
Figura 15 - Distribuição de campo elétrico para a mínima tensão aplicada (1100 V) entre as linhas de agulhas para eletroporar todo o volume tumoral. As setas indicam pontos críticos da geometria, no qual há menor concentração de campo elétrico.....	70
Figura 16 - Distribuição de campo para modelo geométrico dos eletrodos (A) N1 e (B) N2 posicionados no centro do tumor. Plano XY da distribuição de campo elétrico em modelo de tumor elipsoidal superficial por eletrodos (C) N1 e (D) N2 com campo elétrico aplicado de 1500 V/cm. As setas indicam pontos críticos onde não há campo elétrico superior ao limiar de eletroporação reversível.....	71
Figura 17 - Aplicação com eletrodo N2 em metade do tumor. (A) Representa o posicionamento do eletrodo paralelo ao maior	

diâmetro do tumor. (B) Distribuição de campo cobrindo completamente metade do volume tumoral com campo suficiente para eletroporar e matar o tecido alvo. ....	73
Figura 18 - Corte no plano XY de modelo de pele e tumor com eletrodo de dimensões N2. (A) polaridade aplicada às agulhas. (B) Distribuição de campo nos tecidos. As setas indicam alguns pontos sem campo suficiente para eletroporação. ....	74
Figura 19 - Alteração na posição do eletrodo com relação ao tumor. (A) Plano XY da modificação geométrica e a polaridade aplicada no experimento. (B) Distribuição de campo nos planos XY, YZ e ZX para 1025 V aplicados. ....	75
Figura 20 - Variações na polarização do eletrodo N3. A polaridade do pulso de tensão aplicada às agulhas para (C) foi (A) e para (D) foi (B). O potencial elétrico aplicado foi 1500 V. ....	76
Figura 21 - Distribuição de campo para polaridade apresentada em (A). Potencial aplicado de 1450V. O campo elétrico entre agulhas não é homogêneo, mas, capaz de eletroporar todo o volume tumoral. ....	77
Figura 22 - Variação na distância entre linha, $D_L$ . (A) e (C) Acréscimo de 2 mm na distância original, 1000 V. (B) e (D) Acréscimo de 4 mm, $D_L = 14$ mm, 925 V. ....	78
Figura 23 - Resultado da alteração de 10% na distância entre as agulhas na mesma linha, $D_A$ . A seta em (A) representa a direção das modificações. (B) Aumento de 10% na distância original de 7 mm. (C) 90% da distância original. ....	79
Figura 24 - Campo elétrico local para três diferentes reduções no espaçamentos entre agulhas na mesma linha, $D_A$ . (A) 75% da distância original. (B) e (C) $D_A = 3,5$ mm, <i>i.e.</i> 50% do original, em (C) dobrou do número de agulhas de (B). (D) 25% da distância original, ou seja, redução de 75%. ....	79
Figura 25 - Experimento considerando três melhores modificações independentes: Deslocamento do eletrodo no eixo X, aumento de 4 mm em $D_L$ e redução de 50% em $D_A$ . (A) Geometria e polaridade das agulhas no experimento. (B) Distribuição de campo para tensão mínima de 875 V. ....	81
Figura 26 - Corte no plano XY para seis diferentes volumes tumorais. (A) É a estrutura do estudo de caso. O tumor em (F) tem 1% do volume de (A). ....	82
Figura 27 - Limiar de efetividade do tratamento em função da altura do tumor, originalmente 1,25 mm. (A) Aumento de sete vezes na	

	altura do tumor, totalizando 8,75 mm. (B) Primeiro valor simulado a partir do qual o tratamento não é efetivo, altura de 10 mm. (C) Inviabilidade significativa para altura de 11,25 mm. ...	83
Figura 28	- Aplicação com eletrodo tipo III, hexadonal. (A) Visualização 3D do modelo geométrico. (B) e (C) Polarizações aplicada para obtenção dos resultados em (D) e (E). O potencial mínimo encontrado foi 1275 V e 1425 V. As setas indicam a região na qual foram feitos os cortes no plano YZ.....	84
Figura 29	- Quatro diferentes polarizações de tensão aplicadas ao eletrodo tipo III. ....	85
Figura 30	- Eletrodo hexagonal modificado. Inserção da agulha central. (A) Geometria e polaridade utilizada no experimento. (B) Distribuição para o potencial mínimo de 800 V. A seta indica a região na qual foi feito o corte no plano YZ. ....	86
Figura 31	- Eletrodo em matriz com 25 agulhas. (A) Modelo geométrico. (B) e (C) Polarização. (D) e (E) Distribuição para potencial aplicado de 1000 V. ....	87
Figura 32	- Modificação do eletrodo em matriz, retiradas as agulhas centrais. (A) Eletrodo de 16 agulhas e sua polarização. (B) Distribuição de campo para 1100 V. ....	87
Figura 33	- Resumo da conclusão. A margem de segurança depende tanto da geometria do eletrodo, quantos dos pulsos de tensão e características dos tecidos envolvidos. ....	99
Figura 34	- Potencial e corrente elétrica medidos durante o último pulso de tensão para 20, 100 e 160 kV/m (A) e, em (B), comparação entre medições <i>ex vivo</i> e modelo <i>in silico</i> (linha sólida). Pontos e barras representam a média e desvio padrão para quatro experimentos. Linha tracejada representa simulação considerando condutividade constante, 0,23 S/m (GABRIEL; LAU; GABRIEL, 1996b). FONTE: (Suzuki <i>et al</i> , 2016b). ....	106
Figura 35	- Cálculo da distribuição de campo para 1300 V/cm com modelo de eletroporação em duas diferentes posições para o eletrodo durante o tratamento. Os painéis da esquerda mostram corte no plano YZ, enquanto os da direita mostram corte em XY. (A-D) Resultados para simulação com osso abaixo da mucosa oral. (E-H) Apenas mucosa oral FONTE: (Suzuki <i>et al</i> , 2016b). ....	107
Figura 36	- Distribuição do campo elétrico para eletrodo de agulhas inserido no tumor. Painéis da esquerda mostram corte no plano YZ e, painéis da direita mostram plano XY com linha tracejada	

branca indicando as bordas do tumor. (A e B) Resultado para  
simulação com osso abaixo da mucosa oral. (C e D) Apenas  
mucosa. As setas indicam área do tumor que não será eliminada  
pela EQT. .... 108





## **LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 DEFINIÇÕES DOS ESTÁGIOS DE UM CÂNCER (NCI, 2016a).....	38
TABELA 2 PARÂMETROS ELÉTRICOS DOS TECIDOS .....	58
TABELA 3 RESUMO DOS VALORES MÍNIMOS DE TENSÃO PARA CADA EXPERIMENTO E A PORCENTAGEM DA VARIAÇÃO A PARTIR DO ESTUDO DE CASO.....	81
TABELA 4 VALORES MÍNIMOS DE TENSÃO PARA SEIS DIFERENTES VOLUMES DE TUMOR.....	82
TABELA 5 VALORES MÍNIMOS DE TENSÃO PARA DEZ DIFERENTES ALTURAS DE TUMOR.....	83



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARF	<i>Ablação por Radiofrequência</i>
CEUA	<i>Comitê de Ética para Uso de Animais</i>
CCE	<i>Carcinoma de células escamosas</i>
D <sub>A</sub>	<i>Distância entre agulhas na mesma linha</i>
D <sub>L</sub>	<i>Distância entre linhas de agulhas</i>
DNA	<i>Ácido Desoxirribonucleico [Deoxyribonucleic acid]</i>
EQT	<i>Eletroquimioterapia</i>
ESOPÉ	<i>European Standard Operating Procedures of Electroporation</i>
EIR	<i>Eletroporação Irreversível</i>
IEB	<i>Instituto de Engenharia Biomédica</i>
INCA	<i>Instituto Nacional do Câncer</i>
OMS	<i>Organização Mundial da Saúde</i>
RQT	<i>Radioquimioterapia</i>
TC	<i>Tomografia Computadorizada</i>
UFSC	<i>Universidade Federal de Santa Catarina</i>



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>1.1 Organização do Trabalho .....</b>	<b>31</b>
<b>1.2 Justificativa .....</b>	<b>32</b>
<b>1.3 Objetivos .....</b>	<b>33</b>
1.3.1 Objetivo Geral .....	33
1.3.2 Objetivos Específicos .....	33
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>35</b>
<b>2.1 O Câncer .....</b>	<b>35</b>
2.1.1 Definição .....	35
2.1.2 Tipos .....	37
2.1.3 Tratamentos .....	38
<b>2.2 A Eletroporação .....</b>	<b>43</b>
2.2.1 Definição .....	43
2.2.2 Dos Anais da ABC ao congresso mundial em Portoroz .....	44
2.2.3 O fenômeno por trás da eletroquimioterapia .....	44
2.2.4 Modelar para extrapolar .....	47
<b>2.3 Vantagens e erros associados ao software .....</b>	<b>49</b>
<b>3 METODOLOGIA .....</b>	<b>53</b>
<b>3.1 Modelagem Numérica .....</b>	<b>55</b>
<b>3.2 Propriedade dos Tecidos .....</b>	<b>57</b>
<b>3.3 Experimento <i>ex vivo</i> .....</b>	<b>59</b>
<b>3.4 Procedimentos <i>in vivo</i> .....</b>	<b>59</b>
3.4.1 Tratamento de tumor cutâneo .....	60
3.4.2 Tratamento de tumor oral .....	60
<b>3.5 Modelo Geométrico .....</b>	<b>61</b>
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>65</b>
<b>4.1 Aplicação com placas: modelo padrão .....</b>	<b>66</b>
<b>4.2 Estudo de caso .....</b>	<b>68</b>
<b>4.3 Comparação com outros eletrodos disponíveis .....</b>	<b>71</b>
<b>4.4 Variações dos eletrodos N1 e N2 .....</b>	<b>72</b>
<b>4.5 Variações do eletrodo N3 .....</b>	<b>74</b>
4.5.1 Reposicionamento do eletrodo .....	75
4.5.2 Variação na polaridade das agulhas .....	75
4.5.3 Variação na distância entre linhas de agulhas .....	77
4.5.4 Variação na distância entre agulhas na mesma linha .....	78
4.5.5 Junção dos melhores resultados individuais .....	80

<b>4.6 Redução no volume tumoral .....</b>	<b>82</b>
<b>4.7 Aumento na altura do tumor .....</b>	<b>83</b>
<b>4.8 Eletrodo hexagonal e variações .....</b>	<b>84</b>
<b>4.9 Matriz de agulhas e variações .....</b>	<b>86</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>89</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>99</b>
<b>7 TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>101</b>
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>103</b>
<b>1 RESULTADOS .....</b>	<b>105</b>
<b>2 DISCUSSÃO .....</b>	<b>109</b>
<b>3 CONCLUSÃO .....</b>	<b>111</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>113</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>123</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer figura entre as principais causas de morbidade e mortalidade, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS). Cerca de 70% das mortes ocorreram em países da África, Ásia e América Latina (STEWART; WILD, 2015). No Brasil são estimados 600 mil novos casos em 2016-17, sendo o câncer de pele o tipo de maior prevalência no país (INCA, 2016a). Melanoma é um tipo específico, de menor prevalência, mas agressivo (INCA, 2016c). Uma preocupação com os tumores primários reside nos locais de provável metástase. No caso do melanoma, ossos, cérebro, fígado, pulmão e pele/músculo são os principais locais onde as células tumorais que migram tendem a se alojar (Anexo 1). As maiores chances de cura são alcançadas com tratamentos realizados precocemente. Quanto antes for identificado o nódulo tumoral, mais possibilidades têm o profissional da saúde de identificar a conduta adequada de tratamento (NCI, 2016a).

As técnicas atuais vão além da remoção cirúrgica, abrangem a ablação térmica, radiação, quimioterapia e as modernas terapias com eletroporação. Este fenômeno é a abertura de poros na membrana celular com a aplicação de pulsos elétricos curtos e intensos (KINOSITA; TSONG, 1977). Os poros são responsáveis por reduzir a seletividade natural da membrana, através dos quais até mesmo macromoléculas como DNA podem ser inseridas no meio intracelular (MIR, 2000) e (PAGANIN-GIOANNI *et al.*, 2011). Embora ainda não seja completamente claro o mecanismo de formação dos poros, acredita-se na relação entre energia transmitida pela fonte de tensão e o número de poros na superfície celular (BARNETT; WEAVER, 1991). Três estágios são bem definidos no processo: pré-poro, poros reversíveis e irreversibilidade. Para o primeiro estágio, pré-poro, é ampla a literatura no que diz respeito às características elétricas em baixa tensão dos tecidos biológicos, havendo estudos com amplos espectros em frequência (GABRIEL; LAU; GABRIEL, 1996a). Os dois outros estágios, menos estudados, têm despertado cada vez mais interesse e aplicações tecnológicas. A capacidade de abrir, temporariamente, poros na membrana tem possibilitado estudos na área de transformação genética e fusão celular (KOTNIK *et al.*, 2015).

Em se tratando de saúde pública, a associação da eletroporação com a quimioterapia fez surgir a eletroquimioterapia (EQT) (MIR *et al.*, 1991). A técnica é conhecida por reduzir as quantidades de drogas quimioterápicas injetadas no paciente, além do efeito de homeostasia.

Desde a década de 1990 a técnica tem sido estudada na Europa, gerando em 2006 o protocolo padrão de procedimentos para EQT (ESOPE) (MIR *et al.*, 2006), com ampla utilização em ambientes de assistência à saúde no continente europeu. Na América, a técnica tem enfrentado relutância por parte da classe médica, sendo sua utilização restrita a poucos profissionais da área veterinária. Contudo, o Brasil desempenha forte representatividade no emprego da técnica na oncologia veterinária, além de continuada linha de pesquisa na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), buscando fortalecer o entendimento acerca da distribuição de campo elétrico em tecidos biológicos e o fenômeno da eletroporação. Desde 2002, o Instituto de Engenharia Biomédica (IEB) desta universidade, em parceria com a Universidade do Estado de Santa Catarina vem solidificando conhecimentos na modelagem numérica da eletroporação nos três níveis de estudo: células isoladas, suspensões de células e tecidos (RAMOS; SUZUKI; MARQUES, 2004), (SUZUKI *et al.*, 2011) e (SUZUKI *et al.*, 2015). É dentro deste contexto que está inserido o presente trabalho. A modelagem numérica da eletroporação em tecidos permite que futuras implementações sejam feitas unindo imagens dos nódulos reais. A fim de agregar ferramentas capazes de aportar confiabilidade ao processo de planejamento cirúrgico, este trabalho visa contribuir na solidificação da EQT no Brasil.

Nosso principal interesse é investigar possíveis perdas de efetividade do tratamento por falta de visualização do comportamento do campo elétrico no tecido animal. Apenas a ampla e disseminada compreensão do fenômeno poderá trazer aos órgãos da Saúde brasileira a confiabilidade técnica do tratamento. E talvez a EQT logo figure no arsenal das terapias anticâncer no país. É sabido que na eletroporação tanto de células isoladas quanto de suspensões de células, a condutividade do meio extracelular, geometria das células e as características dos pulsos elétricos influenciam na abertura dos poros (KOTNIK; MIKLAVČIČ; SLIVNIK, 1998), (SUZUKI *et al.*, 2011) e (SILVE *et al.*, 2016).

Em tecido, os resultados aqui apresentados permitem afirmar que também tecidos adjacentes interferem na distribuição de campo em um determinado tecido. Nominalmente, a existência de osso abaixo da camada de mucosa oral é capaz de distorcer o campo elétrico na mucosa. Este trabalho questionou ainda a viabilidade no uso dos eletrodos de agulhas para tratamento de tumores cutâneos. Embora os melhores resultados da EQT sejam para pequenos nódulos, grandes tumores têm sido tratados com esta técnica. Nestes casos, situações têm sido reportadas as quais exigem maiores estudos (CAMPANA *et al.*,



2009) e (MATTHIESSEN *et al.*, 2012). Uma dificuldade operacional no tratamento de grandes tumores é o limitado tamanho dos eletrodos (CASTIELLO *et al.*, 2014). Uma solução encontrada na literatura foi avaliada neste trabalho e possíveis problemas ressaltados. Por fim, foi realizado extensivo estudo a partir de um estudo de caso, com o qual obtivemos, além de outros resultados, a conclusão de que linhas de agulhas e placas não apresentam comportamento de campo elétrico idêntico no espaço intraeletrodos. A principal conclusão é perceber que a região entre agulhas de mesma polaridade apresenta campo altamente heterogêneo e a eletroporação pode não ser alcançada por todas as células daquele volume tumoral.

## 1.1 Organização do Trabalho

Esta dissertação de mestrado está dividida em dois capítulos, nos quais são apresentados trabalhos com focos distintos. Embora algumas etapas sejam exclusivas de um dos capítulos, o texto completo é dividido em Introdução, Fundamentação Teórica, Metodologia, Resultados, Discussão, Conclusão, Trabalhos Futuros, Referências e Anexos.

No primeiro capítulo é apresentada a base conjunta sobre câncer e eletroporação, além da metodologia para realização de experimentos *in silico*. Por fim, as seções subsequentes (Resultados, Discussão, Conclusão e Trabalhos Futuros) são específicas do estudo numérico sobre relação geométrica entre eletrodos e tumor cutâneo. O capítulo II está condensado em Resultados, Discussão e Conclusão, específicos aos experimentos realizados para caracterização elétrica da mucosa oral de cachorro.

Na introdução são apresentadas as motivações do trabalho e os objetivos deste estudo. Na fundamentação teórica são apresentados elementos da bibliografia que enquadram esta pesquisa no contexto social e acadêmico. A metodologia utilizada é descrita a seguir e os resultados apresentados nas seções respectivas. O texto é finalizado com a discussão de cada subseção dos resultados, a conclusão, onde são ressaltados alguns pontos cruciais ao nosso entendimento e, propostas para continuidade desta linha de pesquisa. As seções seguintes são a lista de referências utilizadas e, anexo. Todas as figuras neste texto foram criadas pelo autor, exceto quando houver indicação contrária.

## 1.2 Justificativa

O uso da eletroporação está integrado às diversas áreas da pesquisa e suas aplicações. Na saúde pública, a eletroporação tem sido associada a tratamentos como vacinas de DNA, eletrotransferência gênica, técnica de ablação por eletroporação irreversível, ou em associação com quimioterápicos, como na EQT. O Brasil está despontando como líder mundial em aplicação da EQT na oncologia veterinária, sendo o setor privado o responsável pela continuidade e proliferação desta técnica no país.

A medicina brasileira permanece alheia ao impacto que a EQT vem desempenhando no mundo. Talvez seja possível atribuir tal distanciamento entre técnica e seus possíveis usuários pelo restrito espaço que a pesquisa sobre EQT ainda tem na ciência nacional. Além dos primeiros trabalhos sobre modelos de eletroporação pelo grupo do IEB-UFSC, poucos grupos de engenharia se aventuraram na área, a maioria sem continuidade. As escassas utilizações da palavra “eletroporação” por autores da medicina brasileira são arbitrariamente associadas a descargas elétricas. Todavia, na contramão da medicina, a veterinária segue expandindo horizontes e representando o país na comunidade internacional. Aqui, esta pequena parcela de profissionais tem fomentado desenvolvimentos tecnológicos e científicos.

A razoável quantia de publicações sobre o tema realizadas nas duas últimas décadas demonstra a importância do assunto. Todavia, a caracterização elétrica de diversos tecidos animais se mantém necessária. O entendimento de como o campo elétrico interage com os tecidos biológicos encontra-se nos seus passos iniciais. Os modelos atuais não são capazes de conectar o conhecimento da eletroporação em células isoladas ao ambiente macroscópico e plural dos tecidos. Neste trabalho é proposto um primeiro modelo da eletroporação em tecido de mucosa oral, e é discutida a influência dos ossos na distribuição do campo elétrico.

Modelo numérico é uma ferramenta capaz de aportar confiabilidade e segurança ao profissional de saúde durante o processo de planejamento cirúrgico. Os exames por imagem têm fornecido informações sobre localização e geometrias de todos os tecidos envolvidos num procedimento clínico. Estes dados podem ser associados à resolução de cálculo numérico para recriar e prever a execução do procedimento através de ambientes virtuais. O contínuo aprimoramento dos modelos é um passo no encorajamento dos

profissionais da saúde, bem como a representação da continuidade da linha de pesquisa por parte dos pesquisadores do IEB-UFSC e do Brasil.

### **1.3 Objetivos**

De modo a solucionar o problema de pesquisa proposto, foram elencados os seguintes objetivos geral e específicos.

#### **1.3.1 Objetivo Geral**

O objetivo geral do capítulo I deste trabalho é avaliar a utilização de eletrodos de agulhas no tratamento de EQT para tumores cutâneos (superficiais), e possíveis perdas de efetividade do tratamento pelas dimensões do tumor.

No capítulo II, o objetivo geral é obter um modelo numérico para a eletroporação em tecido de mucosa oral.

#### **1.3.2 Objetivos Específicos**

Para atingir o objetivo geral do primeiro capítulo, é necessária a contemplação dos seguintes objetivos específicos:

- Validar os parâmetros de tecidos adotados para eletroporação com a simulação de estudo de caso;

Com o modelo geométrico de tumor do estudo de caso, avaliar:

- Uso do eletrodo de placas paralelas;
- Uso de outros eletrodos disponíveis;
- Variações na polaridade elétrica das agulhas;
- Variações na posição de inserção do eletrodo na pele;
- Alterar as dimensões do nódulo tumoral;

Para atingir o objetivo geral do primeiro capítulo, é necessária a contemplação dos seguintes objetivos específicos:

- Mensurar a resistência elétrica do tecido *ex vivo* durante a aplicação dos pulsos de alta tensão;
- Propor modelo numérico em ambiente de simulação;
- Comparar resultados *in vivo*, *ex vivo* e *in silico*;

## **2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

Nesta seção são apresentados conceitos e definições relevantes ao entendimento da área na qual este trabalho está inserido. São apresentados conceitos referentes a câncer, seus tipos e tratamentos, em especial a eletroquimioterapia por ser a finalidade do processo estudado. Em seguida é apresentado o fenômeno físico da eletroporação, histórico de sua descoberta e modelos que buscam tanto reproduzir quanto explicar o fenômeno. A fundamentação é finalizada com apresentação dos principais erros envolvidos no processo de modelagem, e as precauções necessárias para confiabilidade dos resultados obtidos através destas ferramentas.

### **2.1 O Câncer**

O câncer figura entre as principais causas de morbidade e mortalidade, tendo sido responsável, em suas muitas variações e complicações, por aproximadamente 8,2 milhões de mortes em 2012, destas, 70% ocorreram em países da África, Ásia e América Latina (STEWART; WILD, 2015). Ainda segundo a OMS, estas regiões do globo contabilizam mais de 60% dos 14 milhões de novos casos pelo mundo. É estimado, com base nas taxas de crescimento anuais da doença, que em duas décadas sejam 22 milhões de pessoas com novos casos de câncer. No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), são estimados 600 mil novos casos de câncer no biênio 2016-2017. O tipo mais incidente na população brasileira continuará sendo o de pele (não melanoma) com 180 mil novos casos (INCA, 2016a).

#### **2.1.1 Definição**

O câncer é uma doença complexa com mais de 200 tipos diferentes. As células deixam de responder plenamente aos sinais dentro dos tecidos. Sinais estes responsáveis por regulação de mecanismos como diferenciação, sobrevivência, proliferação e morte celular. Um resultado desta perda de comunicação é o acúmulo de células tumorais nos tecidos, provocando dano local e inflamação (NATURE, 2016). Os

cânceres surgem por um processo evolucionário onde células somáticas sofrem mutação e escapam das restrições que normalmente imperam sobre sua descontrolada expansão. Todavia, há uma relação entre o aparecimento de células com tal comportamento e a capacidade de regeneração tecidual em metazoários. Múltiplos mecanismos estão envolvidos no processo de evitar divisões celulares descontroladas. Estes mecanismos de supressão de tumores são bastante efetivos, pois, apesar dos inúmeros alvos em potencial, cânceres surgem menos de uma vez, em média, ao longo do tempo de vida de um ser humano (LOWE; CEPERO; EVAN, 2004) e (VOGELSTEIN; KINZLER, 2004).

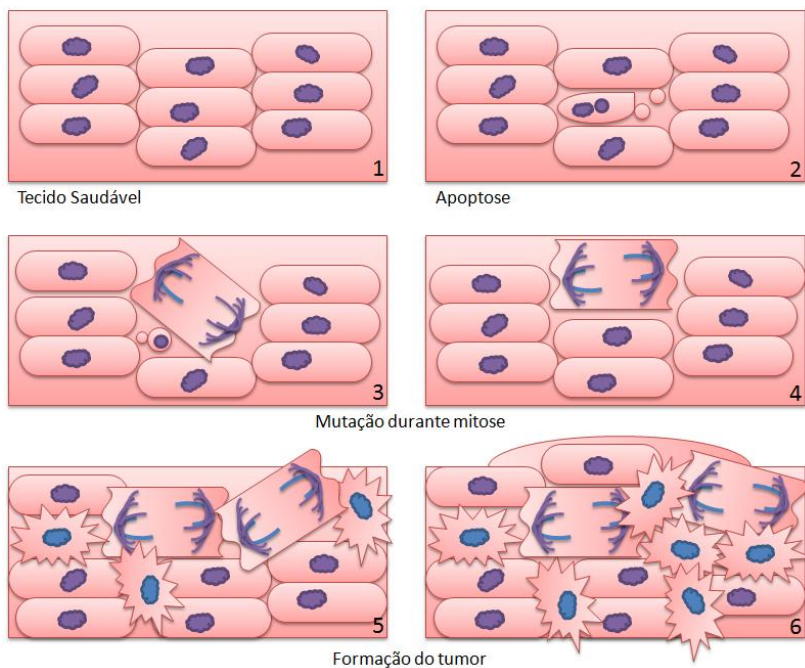


Figura 1 - Esquema representativo do surgimento de um nódulo tumoral a partir da morte de uma célula num tecido saudável (1) se desenvolve um processo de morte celular (2), que em virtude de algum fator mutagênico inicia um processo de multiplicação destas células contendo a mutação (representadas pelo formato estrelado, em 5 e 6). A massa de células mutadas se espalha pelo tecido formando alterações macroscópicas no mesmo.

## 2.1.2 Tipos

Em 2014, a OMS publicou números sobre a doença relativos a 2012. O relatório, além das informações supracitadas, especifica que para homens, os cinco órgãos mais comumente afetados são pulmão, próstata, coloretal, estômago e fígado. Para as mulheres, os pontos diagnosticados foram mamas, coloretal, pulmão, cólo do útero e estômago. Sendo as metástases a principal causa das mortes relacionadas ao câncer. E este, é o principal responsável por mortes ao redor do globo, contabilizando 8,2 milhões em 2012. Em números, cânceres em pulmão levaram a óbito 1,59 milhões de pessoas, seguido por fígado e estômago com 745 e 723 milhões de mortes (STEWART; WILD, 2015). Os principais tratamentos são cirurgia, radioterapia e quimioterapia.

Os cânceres de pele não melanoma englobam carcinomas basocelulares e de células escamosas. Raramente letal, mas sua cirurgia pode ser dolorosa e frequentemente causa desfiguramento. Por ter relação com exposição ao sol, é mais comumente encontrado em partes do corpo como orelhas, face, pescoço e braços (WHO, 2016). Segundo o INCA, o câncer de pele (não melanoma) corresponde a 25% de todos os tumores malignos registrados no país. Pessoas com mais de 40 anos, de pele clara ou com doenças cutâneas prévias são as principais vítimas. O carcinoma basocelular tem uma incidência de 70% na população brasileira, mas é o menos agressivo. Todavia, em 2013 foram registradas 1769 mortes relacionadas ao câncer de pele (INCA, 2016b). O melanoma cutâneo é um tipo de câncer com origem nos melanócitos. Embora represente apenas 4% das neoplasias malignas da pele, são estimados 5670 novos casos em 2016. Este número é preocupante considerando o número de 1547 mortes em 2013. Portanto, ainda que a incidência na população seja reduzida, melanoma é considerado o mais grave dos cânceres de pele, principalmente devido à sua alta possibilidade de metástase (INCA, 2016c).

O estágio de um câncer descreve a severidade da doença, e baseado no seu tipo, tamanho ou extensão do nódulo primário, e na ocorrência de metástase (NCI, 2016a). A TABELA 1 apresenta as definições para os estágios de um câncer. Um câncer metastático tem o mesmo nome do câncer primário, independente de onde tenha ocorrido a metástase. Suas células possuem características moleculares em comum, como expressão de certas proteínas e a presença de específicas alterações cromossômicas. Em tese, todo câncer pode desencadear uma

metástase, incluindo os de sangue e do sistema linfático (leucemia, mieloma múltiplo e linfoma). E, ainda que raro, alguns dos locais de metástase destes cânceres são pulmões, coração e sistema nervoso central. Para a maioria das metástases não há cura (NCI, 2016b). No anexo A são apresentados os principais locais de metástase para alguns tipos de câncer.

TABELA 1  
DEFINIÇÕES DOS ESTÁGIOS DE UM CâNCER (NCI, 2016a)

<i>Estágio</i>	<i>Definição</i>
0	Carcinoma <i>in situ</i>
I, II e III	Números maiores indicam maior extensão da doença: Maior tamanho do nódulo, ou disperso além do órgão original, para linfonodos próximos e/ou tecidos e órgãos adjacentes à localização do tumor primário.
IV	O câncer se espalhou para órgãos e tecidos distantes

### 2.1.3 Tratamentos

Dada a intrínseca relação entre evolução e surgimento de câncer, no inexorável caminho de que aquilo que propulsiona a evolução das espécies também pode ser o responsável pela morte de seus indivíduos. A complexidade da doença exigiu das ciências da saúde o desenvolvimento das mais diversas abordagens de tratamento. Os tratamentos atuais remontam a clássica incisão com os mais modernos dispositivos como bisturi elétrico e braços mecânicos (STRATTNER, 2016); passam pelo desenvolvimento de fármacos de alvo específico da quimioterapia; pela ablação térmica por radiofrequência e crioblação; até os recentes usos de pulsos elétricos de milissegundos na EQT e ablação por eletroporação irreversível (EIR).

O início da quimioterapia remete a década de 1940 com a descoberta da efetividade da mostarda de azoto contra o câncer e da capacidade dos tumores em se tornarem resistentes. Todavia, a quimioterapia moderna começou a se estabelecer na década de 1950 com estudo de purinas análogas como 6-mercaptopurine (6-MP). Foi demonstrado inibição do crescimento de células tumorais. Nas décadas seguintes houve progresso continuado na descoberta de novos agentes químicos e estudos em diferentes tipos tumorais. Contudo, a citotoxicidade de agentes químicos se mostrou frágil perante a grande variedade genética de tumores em tecidos humanos. Apenas alguns



grupos de indivíduos vão responder positivamente a determinado novo tratamento. A extrapolação de resultados em modelos murinos à pacientes humanos também se mostrou insuficiente, em função do rápido metabolismo e tolerância a efeitos colaterais daqueles. Outra constatação foi que mesmo em tumores humanos que respondem ao tratamento, pode haver subclones resistentes ao medicamento. Os agentes antitumor podem ser prejudicados por mecanismos envolvendo expulsão da droga por transportadores ou mutações nas vias de morte celular. Desta maneira, tem sido sugerido que o perfil molecular possa ser um importante no desenvolvimento de novas drogas anticâncer (CHABNER; ROBERTS, 2005).

A descoberta do raio-x se deu em 1895 pelo físico alemão Wilhelm Conrad Röntgen, seguida pelos achados do físico francês Henry Becquerel sobre radioatividade natural. A Emil Grubbé é atribuído o primeiro relato de uso clínico de radioterapia. Apenas sessenta dias após as descobertas no continente europeu foi realizado nos Estados Unidos o tratamento por raios-x de um câncer de mama em estágio avançado. No início, haviam problemas como limitado poder de penetração (apenas 4-6 cm em tecidos moles), sobreaquecimento dos tubos de raios-x, e grande parte das doses era atenuada pelos ossos. Em 1898, a descoberta pela polaco-francesa Marie Curie do Rádio ( ${}_{88}\text{Rd}^{226,02}$ ) como uma fonte natural de fótons de alta energia (ou raios  $\gamma$ ) permitiu avanços no tratamento de tumores profundos. Resolvendo alguns problemas da aplicação externa (telerradioterapia), surgiram técnicas para inserção de radiação gama pelas cavidades do corpo. Na braquiterapia, a fonte de radiação próxima ou dentro do tecido alvo. O advento de radionucleotídeos artificiais como Césio-137 e Irídio-192 possibilitou sua produção em fios finos, que puderam ser inseridos através de tubos plásticos removíveis. Todavia, a radioquimioterapia (RQT) é sugerida em casos de prognóstico crítico quanto à localidade dos nódulos e ocorrência de metástases distantes. A aplicação concorrente de RQT não apenas aumenta a morte de células tumorais, mas também a inibição dos mecanismos de reparo de seu DNA. A radiosensitividade de quimioterápicos como cisplatina, 5-fluorouracil e mitomicina C tem sido demonstrado favorecer a realização concorrente dos tratamentos. Os avanços em exames por imagem, como ultrassonografia, ressonância magnética e tomografia computadorizada (TC) permitem a realização dos procedimentos de forma cada vez mais precisa. E neste sentido, a medicina personalizada tem exigido algoritmos para planejamento de tratamento que sejam mais rápidos e que permitam replanejamentos em tempo real (BERNIER; HALL;

GIACCIA, 2004), (SHIRZADI; SADEGHI-NAINI; SAMANI, 2013) e (BAUMANN *et al.*, 2016).

A ablação térmica de tumores é a aplicação local de temperaturas extremas para induzir dano celular irreversível, e em última instância, apoptose tumoral e necrose de coagulação. A radiação eletromagnética não ionizante e de alta energia é empregada no tratamento de muitos tipos tumorais, como fígado, rim, pulmão, ossos, mama, glândula adrenal e outros. Na década de 1990 houve grande avanço com o desenvolvimento das técnicas de imagem não invasivas (*e.g.* TC), permitindo a realização de procedimentos guiados por imagem. Frente às incisões cirúrgicas, ablação térmica causa menor morbidez, maior preservação dos tecidos circundantes e redução do tempo e custo de internação, além da possibilidade de tratar paciente pouco indicados para submissão à cirurgia. Todavia, existem desvantagens como tratamento parcial e consequente recorrência. Atualmente, as técnicas mais comumente utilizadas são radiofrequência (ARF) e micro-ondas (900 – 2500 MHz), baseadas no aumento de temperatura; e crioablação com redução da temperatura. Não obstante, outras técnicas continuam sendo desenvolvidas como ultrassom focado de alta intensidade e laser. Este último, assim como ARF e micro-ondas, é baseado em aquecimento eletromagnético do tecido. Contudo, a luz é facilmente espalhada e absorvida, limitando a penetração no tecido e, consequentemente, sua aplicabilidade. Na ARF, temperaturas entre 60 °C e 100 °C são geradas no tecido por corrente alternada em altas frequências (usualmente 500 kHz), induzindo aumento de temperatura por efeito Joule. Temperaturas acima de 105 °C são menos efetivas no tratamento por causar ressecamento do tecido e aumento da resistência elétrica. Tipicamente, ARF tem capacidade de tratar lesões menores de 3-5 cm. Na crioablação são empregados gases liquefeitos que retiram calor do tecido e evaporam. Danos celulares ocorrem por interferência no metabolismo, desidratação e formação de cristais de gelo no citoplasma. A letalidade é atingida em células para temperaturas em torno de – 20 °C e – 40 °C, e deve ser mantida por pelo menos 1 cm nas periferias do tumor, sendo este um fator restritivo para aplicação da técnica. Estase venosa, trombose e isquemias no tecido alvo são alguns danos colaterais pós-tratamento. Para tumores maiores, crioablação é preferível ante ARF. O principal limitante dos tratamentos térmicos são os “sumidouros de calor”, que é a intensa vascularização de alguns órgãos, especialmente capaz de drenar grande parte do calor necessário à ablação. Técnicas não térmicas como EQT e EIR são uma saída para

algumas destes inconvenientes (JAHANGEER *et al.*, 2013) e (CHU; DUPUY, 2014).

Duas técnicas baseadas no aumento da permeabilidade da membrana celular tem chamado a atenção. Esta redução na seletividade da membrana é induzida por pulsos de campo elétrico na ordem de microssegundos. Este fenômeno é conhecido por eletroporação e será discutido na seção 2.2. A EQT baseia-se na entrada de quimioterápicos, outrora não permeáveis, nas células tumorais (MIR *et al.*, 1991). É o potencial elétrico que sustenta a formação dos poros e sua manutenção, a retirada do potencial leva ao gradual fechamento dos poros (KINOSITA; TSONG, 1977). A citotoxicidade da terapia é atribuída ao quimioterápico adjuvante (ORLOWSKI *et al.*, 1988). A bleomicina é uma droga citotóxica não permeável na membrana celular, relativamente grande, sendo sua entrada na célula um processo lento e pouco eficiente. Todavia, o efeito citotóxico é favorecido em conjunto com a eletroporação. A efetividade da terapia permaneceu válida para aplicações percutânea *in vivo* (RAMIREZ *et al.*, 1998). Na primeira linha da Figura 2 é mostrado o procedimento de aplicação da EQT, na segunda uma visão microscópica da ação dos pulsos elétricos.

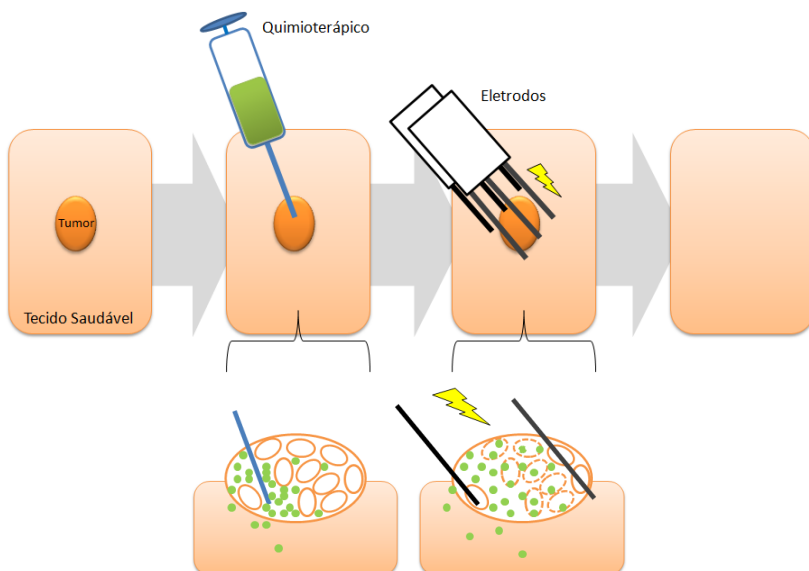


Figura 2 - Esquema das etapas da eletroquimioterapia em tumor cutâneo. Acima, uma visão macroscópica do procedimento de aplicação da EQT. Embaixo, é apresentado o comportamento das moléculas do quimioterápico sendo injetadas no tumor, e em seguida, inseridas nas células tumorais durante a aplicação do pulso elétrico

Diversos estudos *in silico*, *in vitro*, *in vivo*, além das etapas de aplicação multicentro foram realizados nas décadas de 1990 e 2000 (HELLER; GILBERT; JAROSZESKI, 1999), (MIR, 2000), (PUCIHAR; MIR; MIKLAVČIČ, 2002), (BYRNE *et al.*, 2005) e (MIKLAVCIC *et al.*, 2006b). Estes trabalhos geraram evidências científicas suficientes para produção do Protocolo Europeu de Procedimento Padrão para EQT, publicado em 2006 (MIR *et al.*, 2006).

A crescente utilização da EQT em procedimentos clínicos tem gerado substancial quantidade de dados analisados por alguns autores. Boa parte destes trabalhos foi realizada na Europa, uma vez que a incorporação da EQT no sistema de saúde está acelerada. O Brasil, em contra partida, tem desempenhado um papel de destaque no emprego deste tratamento para uso veterinário. Alguns dos tecidos acometidos por câncer e tratados por EQT foram: pele (mastocitomas<sup>1</sup>, carcinoma de células escamosas<sup>2</sup>, metástase de melanoma, sarcoma de Kaposi), fígado (metástase de coloretal), tecidos moles (*e.g.* adiposo, músculo e nervo) e fibrosarcoma. <sup>1</sup>(SUZUKI *et al.*, 2015), <sup>2</sup>(SUZUKI; MARQUES; RANGEL, 2015), <sup>2</sup>(GROSELJ *et al.*, 2015), (QUEIROLO; MARINCOLA; SPAGNOLO, 2014), (DI MONTA *et al.*, 2014), (MALI *et al.*, 2015), (CAMPANA *et al.*, 2016) e (SPUGNINI *et al.*, 2011).

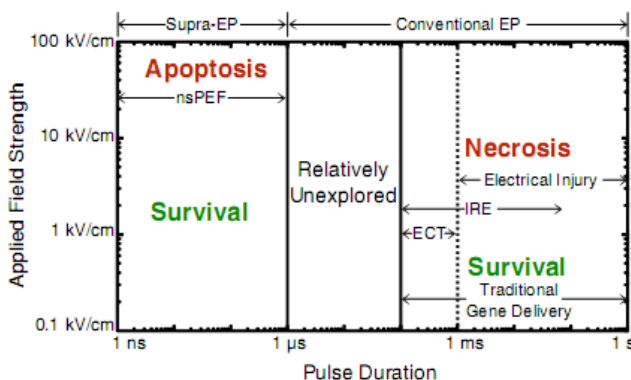


Figura 3 - Relação entre intensidade e comprimento do campo elétrico aplicado para eletroporação. Fonte: (WEAVER *et al.*, 2012)

Enquanto a EQT (ECT, em inglês) utiliza pulsos na ordem de microssegundos para a realização de eletroporação reversível, como mostrado na Figura 3, a EIR (IRE, em inglês) provoca a ablação induzindo poros irreversíveis, os quais provocam a morte celular sem necessidade de agentes quimioterápicos (DAVALOS; MIR;

RUBINSKY, 2005). Por ser uma técnica bastante recente, muitos trabalhos ainda buscam otimizações nas configurações de eletrodos, valores intensidade de campo e comprimento dos pulsos para evitar efeitos térmicos (GARCIA *et al.*, 2011), (GARCIA; DAVALOS; MIKLAVCIC, 2014) e (BONAKDAR *et al.*, 2015).

A compilação de experimentos *in vitro* com linhagens tumorais em fígado (HepG2), pulmão (M109, DC-3F, Lewis), próstata (PC3), tipos de leucemia (THP-1 e K-562) e mieloma (Sp2) (JIANG; DAVALOS; BISCHOF, 2015) através de EIR. Quanto a teste *in vivo*, tratamentos de tumor incluem tecidos como: próstata, pâncreas, rim, coloretal, fígado, (JIANG; DAVALOS; BISCHOF, 2015).

## 2.2 A Eletroporação

Nestas subseções é apresentada a definição deste fenômeno físico, o entendimento da eletroporação desde sua descrição na década de 50 até o aprimoramento dos modelos computacionais por dinâmica molecular.

### 2.2.1 Definição

Eletroporação é o fenômeno de formação de poros hidrofílicos na membrana celular. Quando uma célula – excitável (STAMPFLI, 1957), não excitável (SALE; HAMILTON, 1967), ou vesícula lipídica (TEISSIE; TSONG, 1981) – é exposta a um campo elétrico, há alteração do potencial transmembrana. Ao atingir um limiar de 0,2-1 V, transcorre a formação de poros nos polos da célula (KINOSITA; TSONG, 1977), (NEUMANN *et al.*, 1982), (KINOSITA *et al.*, 1988), (RAMOS; SUZUKI; MARQUES, 2004) e (SUZUKI *et al.*, 2011). Estes poros, momentaneamente, aumentam a permeabilidade e reduzem a seletividade da membrana celular enquanto exposta ao campo elétrico. A eletroporação pode ocorrer em dois níveis de energia, reversível ou irreversível. No primeiro caso, a membrana mantém a capacidade de fechar os poros assim que retirado o campo elétrico, enquanto no segundo, a célula se torna incapaz de manter sua homeotase e viabilidade (DAVALOS; MIR; RUBINSKY, 2005). Todavia, é importante salientar que o fenômeno físico é mais amplamente definido

como eletropermeabilização, e que a formação de poros na membrana é a teoria mais aceita para justificar a perda momentânea de seletividade pela membrana celular (KINOSITA; TSONG, 1977).

### 2.2.2 Dos Anais da ABC ao congresso mundial em Portoroz

A percepção do fenômeno da eletroporação remete à década de 1950, da observação da “ruptura de dielétrico” num estudo sobre nós de Ranvier, publicado por Stämpfli nos Anais da Academia Brasileira de Ciências (STAMPFLI, 1957). Desde então, diversos pesquisadores buscaram esclarecer o fenômeno e propor aplicações. Trabalhos de revisões apresentam um bom panorama (WEAVER; CHIZMADZHEV, 1996), (CHEN *et al.*, 2006), (FOX *et al.*, 2006) e (JIANG; DAVALOS; BISCHOF, 2015).

O uso da eletroporação é amplo e muitas áreas a tem empregado. A eletroporação reversível é encontrada em trabalhos das ciências biológicas em transferências gênicas e fusão celular (CHANG, 1989), (PAGANIN-GIOANNI *et al.*, 2011) e (KOTNIK *et al.*, 2015), como parte de tratamentos oncológicos na eletroquimioterapia (MIR *et al.*, 1991), (MIR *et al.*, 2006) e (SUZUKI *et al.*, 2015) e em ablação por eletroporação irreversível (DAVALOS; MIR; RUBINSKY, 2005) e (JIANG; DAVALOS; BISCHOF, 2015). Ainda com base na irreversibilidade, trabalhos mostram aplicabilidade na esterilização de feridas (GOLBERG *et al.*, 2014) e preservação de alimentos (TOEPFL; HEINZ; KNORR, 2007) e (MAHNIČ-KALAMIZA; VOROBIEV; MIKLAVČIČ, 2014). Diversas outras possíveis aplicações já foram sugeridas (WEAVER, 1993), tendo muitas destas recebido incentivo do projeto europeu de cooperação para em ciência e tecnologia COST TD1104 (COST, 2011). Em 2015 foi realizado em Portoroz, Eslovênia, o I Congresso Mundial sobre Eletroporação (EP4Bio2Med, 2015), sinalizando o crescente impacto científico e tecnológico advindo do estudo do fenômeno da eletroporação e de suas aplicações.

### 2.2.3 O fenômeno por trás da eletroquimioterapia

O campo elétrico imposto pela diferença de potencial elétrico entre os eletrodos atua sobre a membrana celular, como visto no

esquema da Figura 4. Inicialmente, o potencial induzido na bicamada lipídica desenvolve a reorganização estrutural, formando os poros. A entrada de quimioterápicos nas células tumorais não seria possível, ou fortemente desfavorecida numa membrana intacta (MIR *et al.*, 1991). O potencial elétrico sustentado mantém os poros aberto até a extinção do campo elétrico, que leva ao gradual fechamento dos poros (KINOSITA; TSONG, 1977). A citotoxicidade da terapia é atribuída ao quimioterápico adjuvante por agir durante o processo de replicação celular (ORLOWSKI *et al.*, 1988). A bleomicina é uma droga citotóxica não permeável na membrana celular, relativamente grande, sendo sua entrada na célula um processo lento e pouco eficiente. Todavia, o efeito citotóxico é favorecido em conjunto com a eletroporação. A efetividade da terapia permaneceu válida para aplicações percutânea *in vivo* (RAMIREZ *et al.*, 1998). A cisplatina também é um quimioterápico que pode ser utilizado, em substituição a bleomicina (MIR *et al.*, 2006) e (SPUGNINI *et al.*, 2011). Na Figura 2 é mostrado o esquema de aplicação da EQT por eletrodo de agulhas paralelas, ou tipo II.

A distribuição de campo no tecido é intrinsecamente dependente da maneira como o potencial elétrico é aplicado. O estudo do material e dimensões dos eletrodos revela diferentes níveis de citotoxicidade em função de eletrólise do cobre, por exemplo, elevadas densidades de corrente elétrica nos eletrodos hexagonais de pino central, ou elevadas correntes drenadas por eletrodos de placas com associação a géis (GILBERT; JAROSZESKI; HELLER, 1997), (BRANDISKY; DASKALOV, 1999), (ŽUPANIČ; ČOROVIĆ; MIKLAVČIČ, 2008), (COROVIC *et al.*, 2008), (SUZUKI; MARQUES; RANGEL, 2015). Todavia, hoje são comercialmente usados três tipos específicos de eletrodos, referidos como tipo I, II e III. Pelo ESOPE (MIR *et al.*, 2006) é recomendado o uso de eletrodo tipo I (placas paralelas) para tratamento de nódulos tumorais pequenos e superficiais. Tal eletrodo é composto por duas placas que devem ser postas em torno do tumor para aplicação dos pulsos. O reposicionamento das placas implica na medição da distância entre placas e o cálculo do potencial elétrico necessário para aplicação (REBERSEK *et al.*, 2008). No ESOPE é ainda recomendado o uso de eletrodo de agulhas para tumores grandes e profundos. O tipo II engloba eletrodo de agulhas divididas em duas linhas paralelas com três ou quatro pares de agulhas, enquanto o tipo III também é constituído por agulhas, no entanto, organizadas como nos vértices de um hexagonal.

Além das características físicas dos eletrodos, o tipo de onda, a amplitude e frequência aplicadas através dos eletrodos, assim como a

composição e organização do tecido podem modificar a eficiência da eletroporação (KOTNIK; MIKLAVČIČ; SLIVNIK, 1998), (GOLZIO; TEISSIÉ, 2010) e (SUZUKI *et al.*, 2011). Os tecidos biológicos não são simplesmente um conjunto de células individuais justapostas, mas formados por estruturas diversas, organizadas de maneira muitas vezes complexa. Naturalmente, a heterogeneidade dos tecidos e sua estrutura intrincada tornam a visualização da distribuição de campo elétrico uma atividade pouco intuitiva. Para isto, a resolução de modelos de elementos finitos tende a ser uma boa alternativa para obtenção de informação (SEL *et al.*, 2003) e (RAMOS, 2005).

A incorporação destas informações sobre um tratamento de EQT ao simulador passa por simplificações. São feitos modelos que consideram um corte da pele (no caso de tumores superficiais) na forma de paralelepípedo. Cada camada tecidual é superposta sobre a camada anterior, ou seja, epiderme acima da derme, que por sua vez recobre o músculo. O volume tumoral é aproximado por esferas ou elipsóides, e revestido por camadas de derme e epiderme, evitando contato direto do tumor com o ar. Depois, cada domínio é caracterizado eletricamente conforme dados da literatura ou experimentos. Os resultados das simulações são apresentados na forma de fatias representativas da geometria. Esta é uma forma recorrente de expor os resultados (COROVIC *et al.*, 2008), (COROVIC; ZUPANIC; MIKLAVČIČ, 2008), (SUÁREZ *et al.*, 2014) e (SUZUKI; MARQUES; RANGEL, 2015), por permitir a reconstrução tridimensional da distribuição de campo elétrico. A tensão mínima é o primeiro valor de tensão para o qual todo o tumor é coberto por campo elétrico superior ao limiar de eletroporação reversível, 350 V/cm (LACKOVIĆ; MAGJAREVIĆ; MIKLAVČIČ, 2010). Foi estipulado que o máximo potencial aplicado seria de 1500 V/cm, uma vez que este é considerado já um limiar para eletroporação irreversível (HELLER; GILBERT; JAROSZESKI, 1999), (PAVSELJ *et al.*, 2005), (DUPUY; ASWAD; NG, 2011), (NEAL *et al.*, 2012). Através da realização de diferentes simulações é feita uma análise de sensibilidade, buscando otimização do modelo no sentido de determinar o melhor conjunto de características (eletrodo e tumor) para um tratamento efetivo por EQT.



## 2.2.4 Modelar para extrapolar

Diversos trabalhos modelaram o limiar de ruptura da membrana, sem considerar a estocástica formação de poros (CROWLEY, 1973) e (SUGÁR, 1979). Ainda que alguns modelos já apresentassem certa adequação aos resultados experimentais (DIMITROV, 1984), os modelos só começaram a considerar a formação dos poros a partir dos trabalhos de Litster (1975) e Taupin *et al* (1975) (LITSTER, 1975) e (TAUPIN; DVOLAITZKY; SAUTEREY, 1975). Em 1999, Neu & Krassowska apresentou um modelo baseado em equações diferenciais, o que facilitou o desenvolvimento de trabalhos utilizando cálculo numérico (NEU; KRASSOWSKA, 1999) e (DEBRUIN; KRASSOWSKA, 1999). Atualmente, alguns grupos têm realizado simulações de dinâmica molecular, nos quais, são calculadas as propriedades estruturais e termodinâmicas de cada átomo envolvido no sistema (TAREK, 2005), (PARKIN; CHAVENT; KHALID, 2015) e (ENGLISH; WALDRON, 2015). Todavia, esses modelos possuem desvantagens como grande custo computacional associado à limitação temporal e de escala, assim como a duração da corrente de estímulo, geralmente na ordem de 20-50 ns (APOLLONIO *et al.*, 2012) e (REMS *et al.*, 2016). Esta técnica descreve fundamentalmente uma situação de nano-eletroporação nas estruturas intracelulares (e.g. mitocôndrias, núcleo) (CHOPINET; ROLS, 2015). No entanto, tais tempos de simulação não refletem a realidade da eletroporação na membrana celular, com duração dos pulsos na ordem de microssegundos (SUZUKI *et al.*, 2015). Assim sendo, modelos *continuum* são a alternativa para uma visão macroscópica da eletroporação, pela necessidade em aplicações que requerem segurança e controle de eletroporação com pulsos de microssegundos (OLAIZ *et al.*, 2014), (SON *et al.*, 2014), (TRAINITO; FRANÇAIS; LE PIOUFLE, 2015), (SUZUKI; MARQUES; RANGEL, 2015) e (SUZUKI *et al.*, 2016a).

A eletroporação de tecidos animais tem permitido diversos avanços na área da saúde, como a EQT. Todavia, os modelos de eletroporação foram, em sua maioria, voltados para o estudo em célula isolada. Os tecidos biológicos são formados não apenas por um conjunto de células individuais, mas por estruturas como solução e matriz extracelular. Além de ser um ambiente plural, as células contam ainda com ligações e interações célula-célula (GOWRISHANKAR; WEAVER, 2003). Naturalmente, a heterogeneidade dos tecidos e sua estrutura complexa tornam a visualização da distribuição de campo

elétrico uma atividade pouco intuitiva. Portanto, a resolução de modelos numéricos é uma alternativa para obtenção de informações em sistemas complexos como estes (SEL *et al.*, 2003) e (RAMOS, 2005).

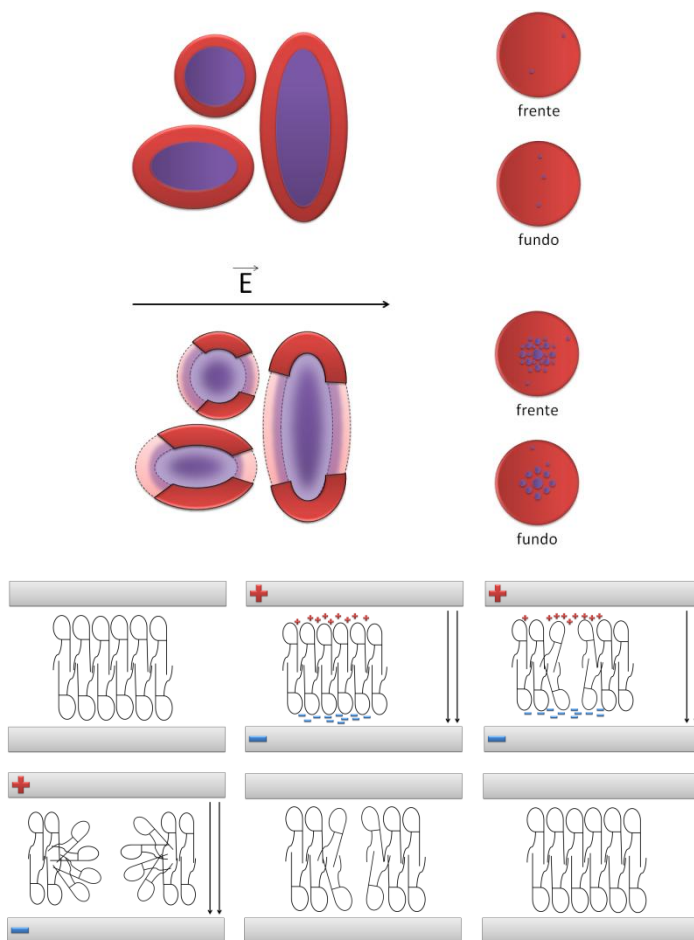


Figura 4 - Eletroporação em nível da célula (acima) e da membrana plasmática (abaixo). O painel superior apresenta um conjunto de células antes e durante a eletroporação, no canto direito, visões da face próxima ao ânodo (frente) e ao cátodo (fundo). A diferença no tamanho e número dos poros nos polos da célula representam resultados experimentais que demonstram haver maior entrada de marcadores fluorescentes no ânodo (GABRIEL; TEISSIÉ, 1997) e (PAGANIN-GIOANNI *et al.*, 2011). No painel inferior são mostradas da formação ao fechamento do poro na bicamada lipídica da membrana pela aplicação de pulso de tensão

## 2.3 Vantagens e erros associados ao software

A simulação é um importante componente do processo de projeto de engenharia em muitos setores. O crescimento da engenharia biomédica nos últimos 10-15 anos tem encorajado o crescimento do uso de tratamento quantitativo dos dados, aumentando o número de novos produtos biomédicos, processos, equipamentos e procedimentos de tratamento. Este tratamento quantitativo dos dados biológicos tem feito da simulação uma ferramenta útil também para aplicações biomédicas. A sinergia entre o aumento do uso da simulação e a disponibilidade de aprimoradas interfaces tem facilitado seu uso, antes restrito aos engenheiros que realizavam as simulações, agora amplo para qualquer um que possui os pré-requisitos do processo físico. A modelagem pode ser entendida como o desenvolvimento de uma réplica num computador de um processo físico, o qual é interessante poder manipular no ambiente virtual (DATTA; RAKESH, 2010).

Independentemente da área de formação do usuário da simulação, o questionamento sobre a confiabilidade dos resultados obtidos é sempre feito. A melhor resposta é sempre obtida quando há capacidade de realizar os experimentos, ou possuir uma base de dados experimentais, para então comparar com os resultados dos modelos. Todavia, não são em todos os casos que se dispõe do aparato experimental necessário, ou desejado. Por esta razão, conhecer os principais fatores que podem atribuir erro ao sistema é uma maneira de tentar mitigá-los. Por conseguinte, Datta & Rakesh (2010) apresentam a distinção entre *incerteza* e *erro* com base naquilo que se conhece durante o processo de modelagem do processo físico.

- Incerteza é a potencial deficiência em qualquer fase ou atividade do processo de modelagem que é devido à falta de conhecimento;
- Erro é a deficiência reconhecível em qualquer fase ou atividade da modelagem e simulação que não é devida a falta de conhecimento.

Os erros podem ser conhecidos (podem ser identificados e removidos, como pelo estabelecimento de procedimentos, ou mantidos no código, mas estimados) ou desconhecidos (que não podem ser evitados por procedimentos, é o caso de erro de programação), e ainda

locais (ocorrem num ponto da malha) ou globais (afetam todo o domínio). Contudo, abaixo são apresentados vários tipos de erros, os quais podem ser tanto devido ao *software* quanto ao como este é utilizado.

- Aproximação física – devido às incertezas na formulação do modelo e simplificações deliberadas do mesmo. Estes erros restringem-se aos modelos *continuum* e dizem respeito à escolha das equações que regem o comportamento do sistema (*i.e.* sólido, líquido, propriedades dos tecidos). As principais fontes de incerteza são: (i) o fenômeno não é completamente entendido; (ii) os parâmetros do modelo são conhecidos, mas com certo grau de incerteza; (iii) simplificações dos modelos apropriados; (iv) confirmação experimental não é possível ou incompleta;
- Arredondamento computacional – acontece pela representação de números de ponto flutuante no computador, e a acurácia com a qual estes números são armazenados, normalmente, em números de 16, 32 ou 64 bits;
- Convergência iterativa – porque os métodos iterativos devem ter pontos de parada eventualmente;
- Discretização – em função da representação de um campo contínuo por equações diferenciais que governam o processo num campo discretizado do espaço (tais como diferenças finitas ou, no caso, elementos finitos);
- Programação do computador – decorrentes de falhas durante a programação ou escrita do código.
- Utilização – pela aplicação do código de maneira menos acurada ou inapropriada. Erros de usuário podem ser controlados através do apropriado treinamento e análise. Contudo, alterações propositais podem ser realizadas visando ganho de velocidade em contraponto a acurácia.

Estes erros não podem ser eliminados completamente, mas podem ser controlados. Há, portanto, a necessidade de se entender a magnitude dos erros para uma solução particular. Dá-se a este processo o nome *validação do modelo*, e a primeira dificuldade da validação é o desconhecimento sobre a solução verdadeira com a qual se deve comparar o resultado da simulação. Em geral, se houvesse a solução verdadeira, não se precisaria do modelo numérico. Além disso, o

processo de validação pode revelar detalhes do processo físico modelado (DATTA; RAKESH, 2010).

Muitas vezes, um fator que aumenta a imprecisão dos resultados é a maneira inapropriada de realizar a malha do domínio de cálculo. O método numérico empregado para resolver o modelo proporciona apenas uma aproximação da solução, e sua acurácia aumenta com a maior discretização, ou seja, com malhas mais finas. Não há fórmula que descreva o tamanho ideal de malha para determinado problema. Assim sendo, o procedimento típico passa pela repetição do processo de geração de malha, progressivamente mais fina até se alcançar estabilidade do valor analisado (sem mais mudanças na variável). Por exemplo, o refinamento da malha até obtenção de variações inferiores a 2% no valor do campo elétrico local (GARCIA; DAVALOS; MIKLAVCIC, 2014).

Após reduzir as influências do software, resta ainda o estudo das limitações do modelo em si. A análise de sensibilidade consiste na avaliação da sensibilidade do modelo aos valores de propriedade dos materiais, parâmetros do modelo, condições de contorno, por exemplo. São razões para considerar tal análise, segundo Datta e Rakesh (2010):

- Para ver como o resultado pode variar em função da incerteza dos parâmetros de entrada;
- Para ver se o comportamento do modelo faz sentido com respeito às mudanças nos parâmetros de entrada;
- Na elaboração de produtos ou processos, o objetivo final da modelagem é, frequentemente, a otimização em relação a vários parâmetros do modelo.

A otimização simples de um problema depende da definição de funções objetivas, as quais se buscam maximizar ou minimizar. Neste contexto, é possível pensar nos problemas como sendo *diretos* ou *inversos*. Problemas diretos dizem respeito a modelos onde a geometria, equações governantes, condições de contorno e as propriedades são dadas, sendo o modelo resolvido para grandezas como temperatura, concentração, fluxo. Um problema inverso é quando se busca uma solução específica, então há necessidade de se fazer a formulação adequada do problema. Por exemplo, na tentativa de destruir um tumor utilizando calor, é conhecida a temperatura necessária para destruição do tecido por crioblação (entre  $-40$  e  $-43$  °C), e se quer preservar todo tecido saudável possível, por conseguinte, a otimização é o processo

para se encontrar o máximo de pontos do tumor com esta temperatura e o mínimo de pontos do tecido saudável na mesma situação (DATTA; RAKESH, 2010).

Neste ínterim, o uso do método de elementos finitos para resolução de problemas para distribuição de campo em tecido biológico, e o estudo da influência do fenômeno da eletroporação celular nesta distribuição foi sugerido no início dos anos 2000 (SEL *et al.*, 2003) e (RAMOS, 2005). Desde então, a técnica tem sido amplamente utilizada (GARCIA *et al.*, 2011), (SUÁREZ *et al.*, 2014) e (DENZI *et al.*, 2015). Neste trabalho estão descritas as resoluções de problemas inversos, ou seja, se conhecia a solução desejada e se buscava o arranjo mais adequado para os eletrodos. A solução desejada era sempre a efetividade do tratamento (isto é, a morte de todas as células tumorais), neste estudo representado pela total cobertura do tumor por campo elétrico superior ao limiar de eletroporação reversível.

### 3 METODOLOGIA

Esta seção contém a descrição da metodologia empregada ao longo do desenvolvimento deste trabalho. São apresentados os materiais disponíveis e de que maneira eles foram utilizados. A metodologia inicia com um passo a passo do desenvolvimento, descrevendo as etapas desde a obtenção do estudo de caso até a retirada dos cortes nos planos ortogonais para apresentação do resultado. A seguir, é detalhado o processo de modelagem numérica (3.1), descrito as propriedades dos tecidos (3.2) e apresentados os modelos geométricos (3.5).

Para encontrar os resultados deste trabalho, foram seguidos os seguintes passos:

- Escolha do estudo de caso;
- Estudo das propriedades elétricas dos tecidos;
- Criação do modelo geométrico e atribuição das características elétricas de cada camada tecidual;
- Divisão do volume geométrico em domínios de cálculo e determinação das tensões aplicadas no experimento;
- Retirada dos cortes representativos da distribuição resultante nos três planos do espaço.

Os relatos de tratamentos veterinários por EQT são obtidos através da parceria entre o IEB-UFSC, na pessoa da Professora Daniela Ota Hisayasu Suzuki, e o grupo, em expansão, de médicos veterinários presentes nos Cursos de Eletroquimioterapia ministrados pelo doutor em veterinária Marcelo Monte Mór Rangel da clínica de oncologia veterinária Vet Câncer (São Paulo, Brasil) e colaboradores. Detalhes que devem constar nos relatos são: informações histopatológicas e geométricas do tumor, tipo do eletrodo e amplitude dos pulsos elétricos empregados e número de sessões necessárias para supressão do tumor. É interessante também a disponibilidade de imagens de antes do procedimento, bem como de meses após a aplicação para confirmar a efetividade do tratamento.

Informações histopatológicas permitem a identificação do tipo tumoral e dos tecidos circundantes. É feito então o levantamento de dados na literatura das características elétricas dos tecidos envolvidos. É possível encontrar trabalhos sobre a condutividade elétrica de alguns tecidos, porém, não de todos os tecidos do corpo, e não de todos os

animais. Uma grande dificuldade desta etapa reside no fato de que há poucos dados referentes à condutividade máxima que atinge um tecido durante a eletroporação. Para obtenção destes dados pode ser necessária a realização de experimentos *in vivo* ou *ex vivo* (capítulo II).

A incorporação destas informações ao simulador é o passo seguinte. São feitos modelos que consideram um corte da pele (no caso de tumores superficiais) na forma de paralelepípedo. Cada camada tecidual é superposta sobre a camada anterior (*e.g.* músculo, derme, epiderme). O volume tumoral é aproximado por esferas ou elipsoides. O modelo de tumor é revestido por camadas de derme e epiderme, evitando contato direto do tumor com o ar. Depois, cada domínio é caracterizado eletricamente conforme dados da literatura.

Gerar a malha, ou domínio de cálculo, é um processo crítico. Há grande diferença na escala das grandezas envolvidas, desde a espessura da epiderme 0,01 mm ao comprimento do modelo 40 mm. Isto gera algumas regiões finas e outras grandes, e automaticamente, o programa ajusta o tamanho dos elementos tetraédricos às menores restrições. Esse procedimento resulta num elevado número de elementos (mais de 300 mil), ou às vezes é até mesmo incapaz de gerar a malha. A solução é dividir o modelo geométrico em regiões com relação às dimensões envolvidas e gerar malhas com granularidades distintas. Outro problema recorrente neste passo é a limitação computacional para execução dos cálculos. O computador é normalmente dedicado à execução das simulações, todavia, modelos com mais de 200 mil elementos na malha estão além da capacidade de processamento atual do grupo.

O último passo é a apresentação do resultado. Diversos experimentos são realizados a fim de determinar a mínima tensão necessária para eletroporar todo o volume tumoral. Esta tensão mínima é o menor valor suficiente para gerar campo elétrico local superior ao limiar de eletroporação em todas as células do tumor. Determinado o valor mínimo, a partir da distribuição de campo no modelo, são retirados três cortes representativos da distribuição. Um corte para cada um dos três planos ortogonais do espaço. Para geometrias simétricas cortes pelo centro da geometria são representativos. Porém, para alguns modelos é necessário procurar pelas regiões críticas (menor campo local) a fim de garantir que todo o volume está coberto por campo superior ao limiar de eletroporação. Em certas situações não é possível determinar um valor de tensão mínimo. Foi estipulado que o máximo campo elétrico aplicado seria de 1500 V/cm, uma vez que este é considerado já um limiar para eletroporação irreversível (HELLER; GILBERT; JAROSZESKI, 1999),



(PAVSELJ *et al.*, 2005), (DUPUY; ASWAD; NG, 2011), (GARCIA *et al.*, 2011), (NEAL *et al.*, 2012).

Estudos com material biológico requerem análise por parte de um Comitê de Ética (por exemplo, para Uso de Animais, CEUA). Este projeto foi reportado ao CEUA-UFSC e está de acordo com a legislação institucional vigente.

### 3.1 Modelagem Numérica

A forma como o potencial elétrico se distribui num material dielétrico pode ser bastante complexa. Em materiais com características heterogêneas como a pele ou outros órgãos essa tarefa é ainda mais desafiadora.

A resolução de equações diferenciais pelo método de elementos finitos tem sido aplicada para resolver problemas das ciências naturais e engenharias. (DIMAIO; SALCUDEAN, 2003), (RAMOS; SUZUKI; MARQUES, 2004), (SHIRZADI; SADEGHI-NAINI; SAMANI, 2013) e (MEIR; RUBINSKY, 2015).

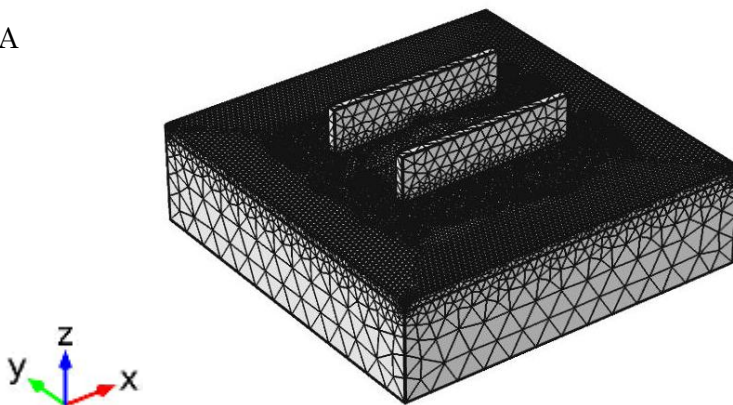
Diversos modelos foram desenvolvidos aplicados ao estudo da eletroporação em células (NEU; KRASSOWSKA, 1999), (RAMOS, 2005) e (LEGUÈBE *et al.*, 2014). Para tecidos, (MIKLAVCIC *et al.*, 2004) apresenta o modelo que serviu de base para as simulações apresentadas na seção de Resultados.

Para determinação da distribuição de campo elétrico nos tecidos biológicos foi utilizado o programa COMSOL Multiphysics® (versão 5.0, COMSOL AB, Estocolmo, Suécia) em um computador (com processador Intel Core i5-2500, CPU@3,3 GHz com 4 GB de RAM) rodando sistema operacional Windows 7 (barramento de 64 bits, Microsoft, Inc., Redmond, Estados Unidos).

O método de elementos finitos requer a segmentação da estrutura em análise. A divisão do sólido em elementos infinitesimais permite que o cálculo seja executado rapidamente considerando as condições locais e dos elementos fronteiros. A redução da área dos elementos implica no aumento na sensibilidade e definição do resultado, todavia, eleva o esforço computacional. O número total de elementos é diretamente proporcional à área de cada elemento, desta maneira, buscou-se um número de elementos que atendesse às restrições do programa tanto em quantidade quanto em área. Para cada estrutura geométrica estudada, em função das dimensões envolvidas, varia a dificuldade em gerar a malha.

No caso de um dos modelos geométricos estudados em (BERKENBROCK; RANGEL; SUZUKI, 2016), a malha era formada por 162.163 elementos tetraédricos. Em geral, o número de elementos esteve dentro de um intervalo entre 110.000 e 190.000. A Figura 5 apresenta a malha gerada para duas diferentes geometrias.

A



B

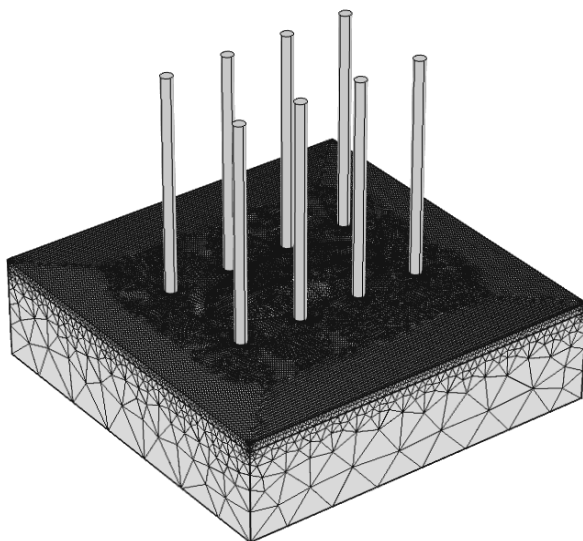


Figura 5 - Modelos geométricos com malha gerada para definição dos domínios de cálculo. (A) Modelo considerando tratamento por eletrodos de placas paralelas. (B) Estudo de caso, com aplicação dos pulsos através de eletrodo de agulhas (tipo II). Não há necessidade de executar cálculos de campo elétrico nos eletrodos de metal (*e.g.* cobre, aço inox), ocasionando redução do esforço computacional.

Na EQT se aplicam 8 pulsos de 100  $\mu$ s de tensão. Porém, na modelagem é utilizada uma formulação eletrocinética, considerando o comportamento do campo elétrico em regime permanente (módulo DC do COMSOL). A equação que é resolvida numericamente é dada por:

$$\nabla \cdot (\sigma \nabla V) = 0 \quad (1)$$

Onde  $\sigma$  representa a condutividade elétrica do tecido (S/m) e  $V$  é o potencial escalar elétrico (V). As condições de contorno, necessárias para garantir a unicidade da solução, aplicadas foram de Dirichlet que são as tensões nos eletrodos (agulhas ou placas).

### 3.2 Propriedade dos Tecidos

O modelo de Miklavcic e colaboradores (2004) descreve a alteração da condutividade local do material em função do campo elétrico local. A equação (2) é apresentada abaixo e o gráfico com as curvas para diferentes materiais na Figura 6.

$$\sigma(E) = \sigma_0 + \frac{\sigma_{m\acute{a}x} - \sigma_0}{1 + D \cdot e^{-\left(\frac{E - A}{B}\right)}} \quad (2)$$

$$A = \frac{E_{irrev} + E_{rev}}{2} \quad B = \frac{E_{irrev} - E_{rev}}{C}$$

Onde  $\sigma_0$  representa a condutividade elétrica basal do tecido e  $\sigma_{m\acute{a}x}$  é a máxima condutividade atingida pelo tecido durante a eletroporação. Os limiares de reversibilidade e irreversibilidade de campo elétrico para cada tecido são dados por  $E_{REV}$  e  $E_{IRREV}$ , respectivamente. As constantes  $C = 8$  e  $D = 10$  são parâmetros da função sigmoide definidos por (MIKLAVCIC *et al.*, 2004).

Uma importante etapa é a pesquisa pelos dados específicos que caracterizam eletricamente o tecido biológico. Os dados apresentados na TABELA 2 foram obtidos de (COROVIC *et al.*, 2013a). Todavia, Ivorra e colaboradores sugerem outros possíveis comportamentos e diferentes

parâmetros que caracterizam eletricamente o tumor (IVORRA *et al.*, 2008) e (IVORRA *et al.*, 2009). Todos os tecidos foram considerados homogêneos.

TABELA 2  
PARÂMETROS ELÉTRICOS DOS TECIDOS

	$\sigma_0$ (S/m)	$\sigma_{MÁX}$ (S/m)	$E_{REV}$ (kV/m)	$E_{IRREV}$ (kV/m)
SC + Epiderme	0,008	0,008	40	120
Derme	0,250	1,000	30	120
Músculo	0,135	0,340	20	80
Tumor	0,300	0,750	40	80
Tumor *	0,150	0,260	10	160
Tumor **	0,135	0,338	40	80

Dados obtidos de \* (IVORRA *et al.*, 2008) e \*\* (IVORRA *et al.*, 2009)

No gráfico da Figura 6 estão traçadas as curvas descritas pelos parâmetros da TABELA 2 quando aplicados na equação 2.

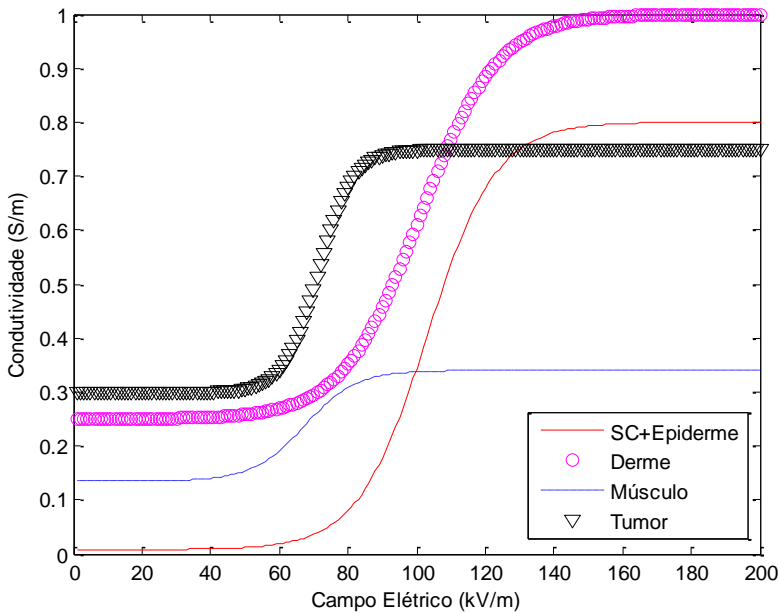


Figura 6 - Gráfico da condutividade em função do campo elétrico para diferentes tecidos biológicos.

### 3.3 Experimento *ex vivo*

Para os experimentos *ex vivo* foram utilizados ratos Wistar machos, albinos, pesando entre 180-210 g, os quais foram eutanaziados com idade entre 50-55 dias. Os animais foram criados, mantidos e sacrificados pelo Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais do Departamento de Bioquímica da UFSC. Após decapitação, as cabeças foram embrulhadas em folhas de jornal e transportadas em caixas de isopor, por aproximadamente 12 minutos, até o IEB-UFSC onde foram realizados os ensaios elétricos. Utilizando tesoura foram feitas incisões transversais na mucosa oral, tão próximo quanto possível do maxilar, no sentido do eixo ântero-posterior. A mucosa oral exposta permite inserção dos eletrodos no tecido. Para aplicação dos pulsos de tensão, foram utilizadas duas agulhas de aço inoxidável com diâmetro de 0,55 mm e espaçadas por 2 mm. As agulhas, com comprimento de 3 mm, foram totalmente inseridas no tecido. As dimensões foram mensuradas com uso de paquímetro (Starrett 125 6/150). A manipulação dos animais e as medições elétricas foram realizadas em menos de 4 h (SUROWIEC; STUCHLY; SWARUP, 1985) e em sistema de ar condicionado com temperatura de 25 °C. Foram realizadas quatro medições com três diferentes animais. Um gerador de pulsos quadrados foi desenvolvido para fornecer trens de oito pulsos de 40 a 440 V, com duração de 100  $\mu$ s e repetição a 1 Hz. A corrente drenada da fonte durante o último pulso de tensão foi mensurada com osciloscópio digital TDS 2004C (Tektronix, Inc., Estados Unidos). Os dados de tensão e corrente foram armazenados em cartão de memória para posteriores análises. Todos os animais foram monitorados e mantidos de acordo com o comitê de ética para uso de animais (Protocolo CEUA-UFSC PP00749).

### 3.4 Procedimentos *in vivo*

Nesta seção são apresentados os procedimentos *in vivo* realizados pelo colaborador da pesquisa no tratamento dos nódulos tumorais estudados.

### 3.4.1 Tratamento de tumor cutâneo

O animal era uma cadela de raça não identificada de 9 anos e com formação ulcerada de carcinoma de células escamosas (CCE). Havia inúmeras lesões na região abdominal, se estendendo da face medial do membro traseiro direito a região distal do fêmur. O diâmetro dos nódulos era entre 3 e 25 mm.

O procedimento de tratamento foi realizado de acordo com o ESOPE. O animal foi anestesiado e recebeu injeção intravenosa de bleomicina ( $15.000 \text{ IU/m}^2$ ) antes da aplicação dos pulsos elétricos. Em uma única sessão, foram aplicados 8 pulsos de  $1300 \text{ V/cm}$ , com duração de  $100 \mu\text{s}$  e repetidos na frequência de  $10 \text{ Hz}$ . Foi utilizado o gerador de pulsos BTX ECM 830 (Havard Apparatus, Estados Unidos). Foi utilizado o eletrodo tipo II, com três pares de agulhas de aço inoxidável. As agulhas tem diâmetro de  $0,7 \text{ mm}$ , os pares separados por  $3 \text{ mm}$  ( $D_A$ ) e a distância entre agulhas do mesmo par ( $D_L$ ) é  $5 \text{ mm}$ . Após o tratamento, o paciente foi monitorado clinicamente por 373 dias sem ter sido observado sinais de recorrência do câncer.

### 3.4.2 Tratamento de tumor oral

O animal era um cachorro da raça Pincher de 13 anos com formação espontânea de melanoma na mucosa oral. O diâmetro do nódulo era aproximadamente  $4 \text{ mm}$ . Este animal recebeu o mesmo tratamento descrito na subseção anterior. O paciente foi monitorado clinicamente por 12 meses e não apresentou recorrência de tumor.

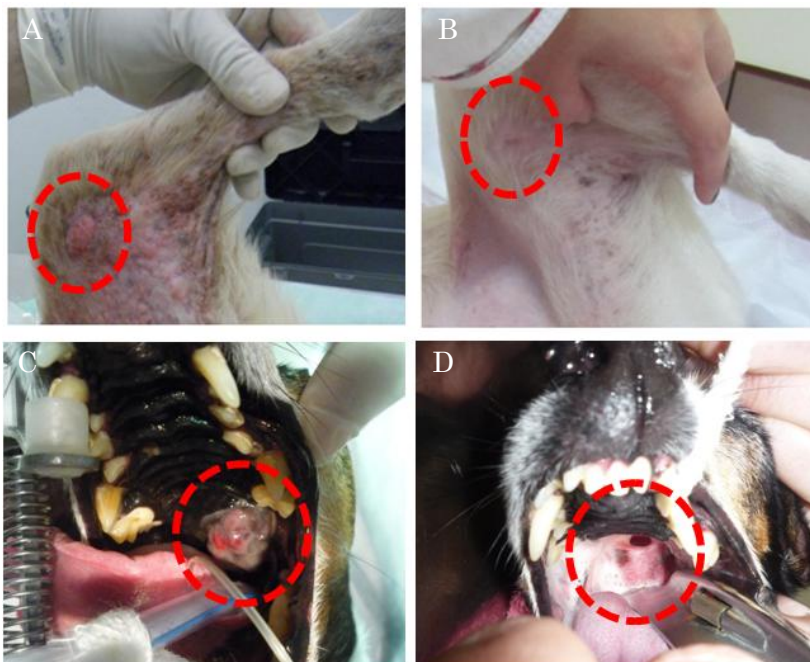


Figura 7 - Estudos de casos veterinários. Nódulos de carcinoma de células escamosas (A) antes e (B) 9 meses após o tratamento por EQT. Melanoma oral (C) antes e (D) 33 dias após tratamento por EQT.

### 3.5 Modelo Geométrico

A geometria aplicada no COMSOL é baseada no estudo de caso, apresentado na Figura 7A. Tumores podem ter formatos diversos, todavia, tumores cutâneos são normalmente aproximados por formas esféricas e elipsoidais. (ŽUPANIČ; ČOROVIC; MIKLAVČIČ, 2008). Um motivo é a limitação imposta pelo programa de simulação, que não é específico para desenho de estrutura complexas. No estudo de tumores internos têm sido utilizadas imagens médicas para definir a geometria (ZUPANIC; KOS; MIKLAVCIC, 2012), porém para tumores superficiais, os modelos obtidos pela revolução de geometrias euclidianas continuam sendo empregados (COROVIC *et al.*, 2013a) (SUZUKI *et al.*, 2015).

Neste estudo, o tumor foi representado como um elipsoide. Este sólido é definido pelas dimensões associadas ao diâmetro maior (a),

diâmetro menor (b) e altura (c). As dimensões foram obtidas do estudo de caso e são  $a = 20$  mm,  $b = 10$  mm e  $c$  foi definido pela fórmula de volume. O volume de um elipsoide é dado por:

$$volume = \frac{4}{3} \pi \cdot a \cdot b \cdot c \quad (3)$$

O inconveniente nesta formulação consiste no fato de, na prática, não se conhecer a altura, portanto, é possível utilizar a equação 4, a qual baseia-se apenas nas projeções na superfície. A qual é utilizada em procedimentos veterinários para determinação da quantidade de quimioterápico necessário para o tratamento (MIR *et al.*, 2006).

$$volume = \frac{a \cdot b^2 \cdot \pi}{6} \quad (4)$$

Em posse das equações 3 e 4, a altura do elipsoide foi determinada como  $c = b/8 = 1,25$  mm. A Figura 8 apresenta o modelo geométrico definido em COMSOL.

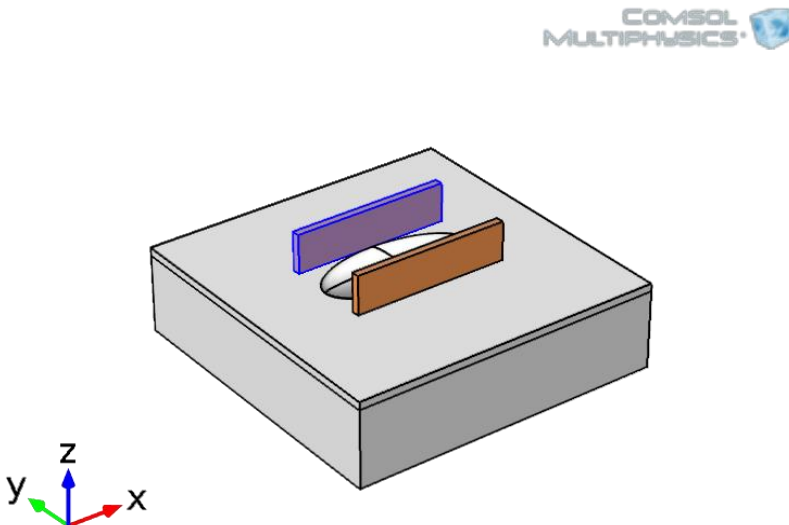


Figura 8 - Modelo geométrico com eletrodo de placas.



Epiderme, derme e músculo foram considerados paralelepípedos retos de 40 mm por 40 mm. As alturas (ou espessuras dos tecidos) são 0,05 mm, 1 mm, 10 mm, respectivamente. O tumor é revestido por uma camada de epiderme. As placas de cobre têm espessura de 1 mm, comprimento de 20 mm e altura de 5 mm.

O modelo da Figura 8 representa o modo de tratamento sugerido pelo Procedimento Operacional Padrão Europeu para Eletroquimioterapia (MIR *et al.*, 2006). Todavia, a praticidade e versatilidade obtida pela utilização de eletrodos de agulhas faz que tal arranjo seja amplamente empregado. Na Figura 9 é apresentado o mesmo tumor modelado anteriormente, porém com aplicação dos pulsos elétricos através do eletrodo de agulhas.

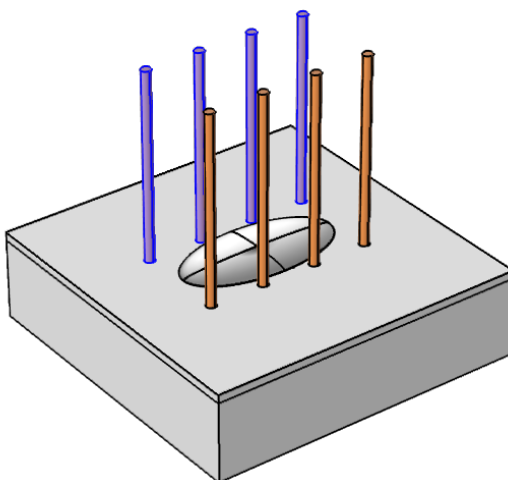


Figura 9 - Modelo geométrico com eletrodo de agulhas paralelas.

Para o modelo geométrico da Figura 9 foram preservadas as dimensões da pele. O eletrodo de agulha é composto por quatro pares de agulhas. A distância entre agulhas do mesmo par, ou distância entre linhas, é 10 mm, enquanto a distância entre os pares, ou distância entre agulhas na mesma linha, é 7 mm. Todas as dimensões definidas nestes modelos foram rigorosamente baseadas nas descrições do doutor veterinário Marcelo Monte Mór Rangel da clínica de oncologia veterinária Vet Câncer (São Paulo, Brasil).

Nesta seção foram apresentados dois tipos de eletrodos, e a geometria do tumor estudado. Todavia, no decorrer do projeto, diversos arranjos de agulhas foram testados, inclusive configurações não

comerciais (seção 4.9). Para não tornar a metodologia demasiadamente extensa com todos os modelos geométricos, foram apresentados apenas os dois principais modelos. Os demais arranjos são apresentados na seção 4 juntamente com o resultado das simulações.

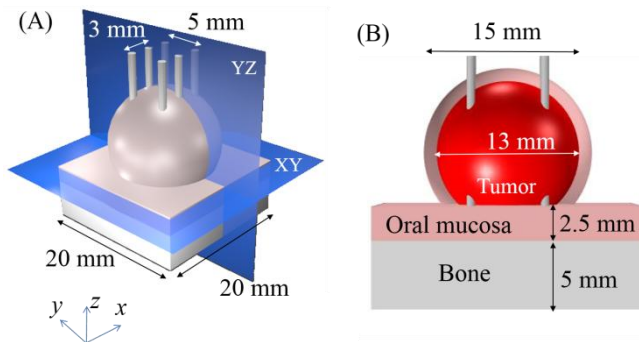


Figura 10 - Modelo geométrico de câncer oral e eletrodos. (A) Modelo 3D do tumor em simulação. A partir dos cortes YZ e XY são analisadas as distribuições de campo elétrico. A esfera sólida representa o tumor, e está envolvida pela camada de mucosa oral. (B) Dimensões e descrições dos tecidos. FONTE: (Suzuki *et al*, 2016b).

O modelo de tumor esférico na Figura 10 é composto por três tipos de tecido biológico: tumor, mucosa oral, e osso. A condutividade elétrica do osso foi considerada constante e igual a 0,01 S/m (GABRIEL; LAU; GABRIEL, 1996b). A condutividade inicial do tumor é idêntica a apresentada na Figura 6 e na TABELA 2. Os parâmetros da eletroporação de mucosa oral foram determinados através dos experimentos *ex vivo*. A anatomia da cavidade bucal produz duas considerações distintas durante o processo de modelagem. O modelo de tecido considera espessura de 5 mm para o osso (HOURFAR *et al.*, 2015), recoberto por 2,5 mm de mucosa oral (SONG *et al.*, 2008). O tecido modelado tem área de 20 x 20 mm. Na segunda consideração, não foi utilizado o tecido de osso, mas apenas a mucosa oral com 7,5 mm de espessura (SONG *et al.*, 2008). O tumor tem 15 mm de diâmetro e está envolvido por uma camada de 1 mm de mucosa oral, como mostrado na Figura 10B. No modelo numérico apresentado na Figura 10 foi gerada uma malha de 145.078 elementos tetraédricos pelo COMSOL. O estudo com pequeno tumor, Figura 36, foi realizado com tumor de 4 mm de diâmetro e 1 mm de camada de mucosa oral. Neste estudo, o tumor encontra-se próximo ao osso. Os tecidos modelados e suas espessuras são os mesmos dos apresentados acima. O modelo numérico é composto por 48.917 elementos tetraédricos para execução dos cálculos.

## 4 RESULTADOS

Nesta seção são apresentados os resultados das simulações empregando a metodologia anteriormente detalhada, seção 3. A análise dos experimentos foi feita com base na distribuição de campo elétrico nos tecidos estudados. Majoritariamente, os resultados são apresentados na forma de fatias representativas da geometria. Esta é uma forma recorrente de expor os resultados (COROVIC *et al.*, 2008), (COROVIC; ZUPANIC; MIKLAVCIC, 2008), (SUÁREZ *et al.*, 2014) e (SUZUKI; MARQUES; RANGEL, 2015), pois permite a reconstrução tridimensional da distribuição de campo elétrico. A distribuição de campo é representada como na Figura 11 e deve ser interpretada da seguinte maneira:

- Área preta – não ocorre eletroporação – campo elétrico local inferior ao limiar de eletroporação reversível.
- Área colorida – ocorre eletroporação reversível – campo elétrico local é superior ao limiar de eletroporação reversível e inferior ao limiar de eletroporação irreversível. As células mantêm sua capacidade de reorganizar a membrana e fechar os poros.
- Área branca – ocorre eletroporação irreversível – campo elétrico local é superior ao limiar de eletroporação irreversível. As células perderam a capacidade de fechar os poros e retornar ao estado inicial, anterior à eletroporação.

As setas tracejadas na Figura 11 indicam o local de onde foram retiradas a maiorias das fatias bidimensionais apresentadas nas figuras deste texto. Em sua maioria, há um grau de simetria nas geometrias, sendo simples a escolha do local das vistas. Todavia, a heterogeneidade da distribuição de campo ao longo dos eletrodos de agulhas, por vezes, requereu alteração no local dos cortes bidimensionais. Assim, cortes específicos enfatizam os possíveis problemas. Foram analisados os pontos com campo menos intenso, portanto, na Figura 14 o corte YZ foi no centro, enquanto na Figura 19 o corte foi deslocado para outra posição.

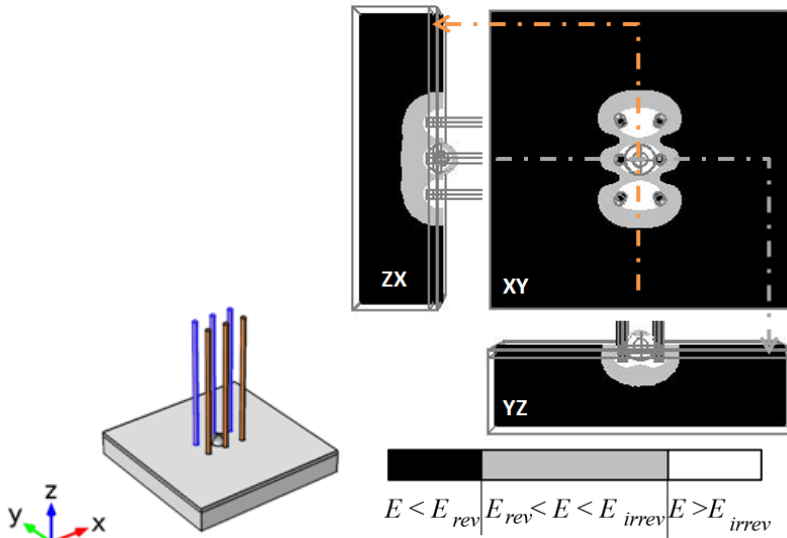


Figura 11 - Exemplo de visualização do resultado. À esquerda a geometria tridimensional. À direita três fatias dos planos ZX, XY e YZ. As setas tracejadas indicam o local de onde são retiradas as fatias. A escala representa a intensidade de campo elétrico local.

#### 4.1 Aplicação com placas: modelo padrão

A aplicação dos pulsos de tensão em tratamentos de tumores superficiais é comumente realizada através de eletrodos de placas (GIARDINO *et al.*, 2006), (IVORRA *et al.*, 2008) e (SUZUKI *et al.*, 2015). Por esta razão, no primeiro experimento foram aplicados 1300 V/cm (MARTY *et al.*, 2006) no modelo apresentado na Figura 8 e resultado na Figura 12A.

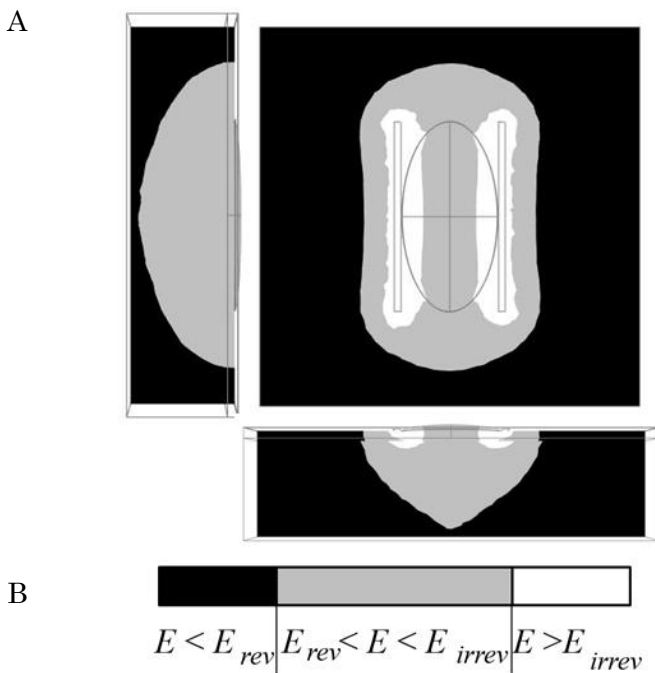


Figura 12 - Distribuição de campo elétrico em modelo de pele. (A) Simulação de aplicação por placas. (B) Legenda de tons para diferentes intensidades de campo elétrico local. Em preto representa região de tecido onde não ocorre eletroporação; área em branco representa região de eletroporação irreversível; em cinza significa ocorrência de eletroporação reversível. As cores não representam variações reais da pigmentação dos tecidos.

A Figura 13 apresenta a distribuição de campo elétrico para a mínima tensão aplicada entre os eletrodos. Foram realizados diversos ensaios para determinar o menor valor de tensão para eletroporar o tumor. A tensão mínima é o primeiro valor de tensão para o qual todo o tumor é coberto por campo elétrico superior ao limiar de eletroporação reversível, 350 V/cm (LACKOVIĆ; MAGJAREVIĆ; MIKLAVČIČ, 2010). Na Figura 13, em preto é representada a área na qual o campo elétrico é inferior a 350 V/cm. Para esta estrutura foi determinado o valor mínimo de 750 V e corrente total de 0,32 A. Para tensão de 1300 V a corrente foi de 1,74 A.

Embora seja sugerido o uso de placas para nódulos superficiais com diâmetro de até 8 mm (MIR *et al.*, 2006) e (GIARDINO *et al.*, 2006), estes resultados mostram que com eletrodos de placas é possível

tratar tumor elipsoidal destas dimensões. Outras abordagens são apresentadas nas seções seguintes.

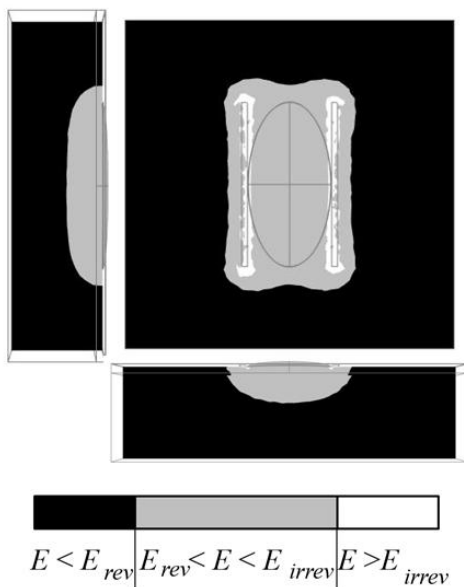


Figura 13 - Determinação do potencial elétrico mínimo necessário a ser aplicado durante o tratamento para que o tumor esteja completamente imerso em campo elétrico superior ao limiar de eletroporação.

Estes resultados são importantes para compararmos com os obtidos no experimento seguinte. Conhecer a distribuição de campo elétrico para aplicação de placas facilita a compreensão das informações que obtemos com a simulação do estudo de caso.

## 4.2 Estudo de caso

O tratamento do tumor em questão foi realizado através do uso de eletrodos de agulhas paralelas, com campo elétrico aplicado de 1300 V/cm. Esta condição está representada na Figura 9 e o resultado da simulação na Figura 14 a corrente total calculada foi 0,39 A.

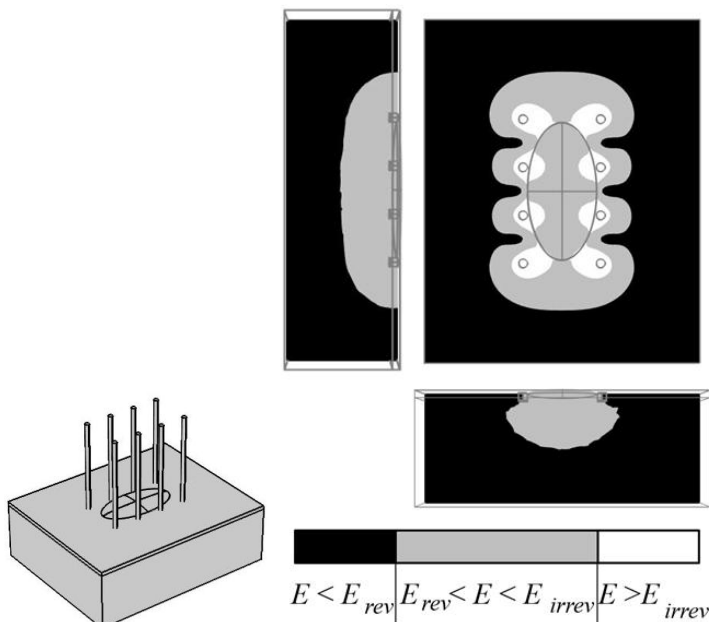


Figura 14 - Simulação do estudo de caso

Assim como na seção anterior, foi determinado para esta geometria o valor mínimo de tensão. Diferente do estudo com placas, o eletrodo de agulha resultou num valor de tensão mínima próximo ao valor de tensão aplicado, 1100 V. A corrente calculada foi de 0,24 A. Esta limitação à redução ocorreu no plano YZ, nas regiões indicadas pelas setas no plano XY da Figura 15. Na seção 4.5 são apresentados arranjos de agulhas para evitar estes pontos com pouco campo elétrico.

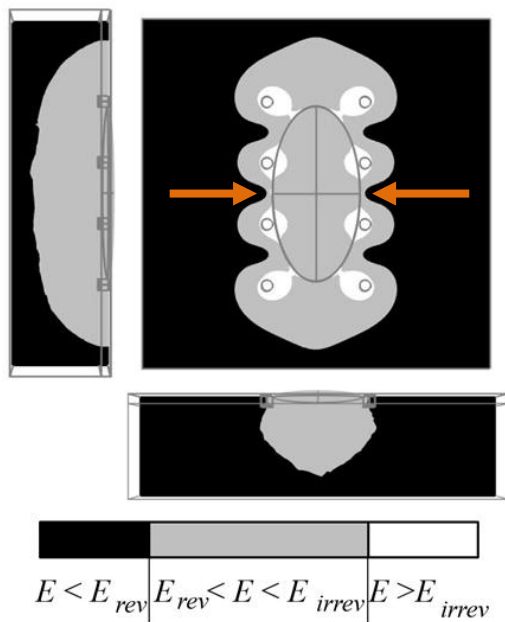


Figura 15 - Distribuição de campo elétrico para a mínima tensão aplicada (1100 V) entre as linhas de agulhas para eletroporar todo o volume tumoral. As setas indicam pontos críticos da geometria, no qual há menor concentração de campo elétrico.

A importância de conhecer o menor valor de tensão que pode ser aplicado no eletrodo suficiente para eletroporar todo o tumor consiste na recorrente possibilidade dos equipamentos comerciais de EQT não serem capazes de fornecer a corrente necessária para o tratamento. Assim sendo, definir um valor mínimo para cada geometria (tumor e eletrodo) facilita a comparação da robustez do eletrodo contra instabilidade da fonte de tensão. Por esta razão, as demais simulações apresentadas neste trabalho visam: demonstrar se seria possível tratar este tumor com outros tipos de eletrodos; e qual o valor mínimo de tensão que pode ser aplicado ao eletrodo para manter a eletroporação de todo o volume tumoral.

A seguir são apresentados dois outros eletrodos possíveis de serem utilizados pelo médico veterinário. Com diferentes dimensões, os eletrodos N1 e N2 também são do tipo II (agulhas paralelas) assim como o N3 apresentado anteriormente. Porém, mais adequados para tumores menores.



### 4.3 Comparação com outros eletrodos disponíveis

Nesta seção foram avaliadas as outras duas opções de eletrodo disponíveis para uso no tratamento. Para os modelos geométricos da Figura 16A-B foram preservadas as dimensões da pele da Figura 9. O eletrodo da Figura 16A é composto por três pares de agulhas, enquanto o da Figura 16B por quatro pares. Para o eletrodo N1, a distância entre agulhas do mesmo par, ou distância entre linhas, é 5 mm, enquanto a distância entre os pares, ou distância entre agulhas na mesma linha, é 5 mm. Para N2, as distâncias são 7 mm e 6 mm, respectivamente. A altura dos eletrodos não influencia o resultado em estudos de tumores superficiais.

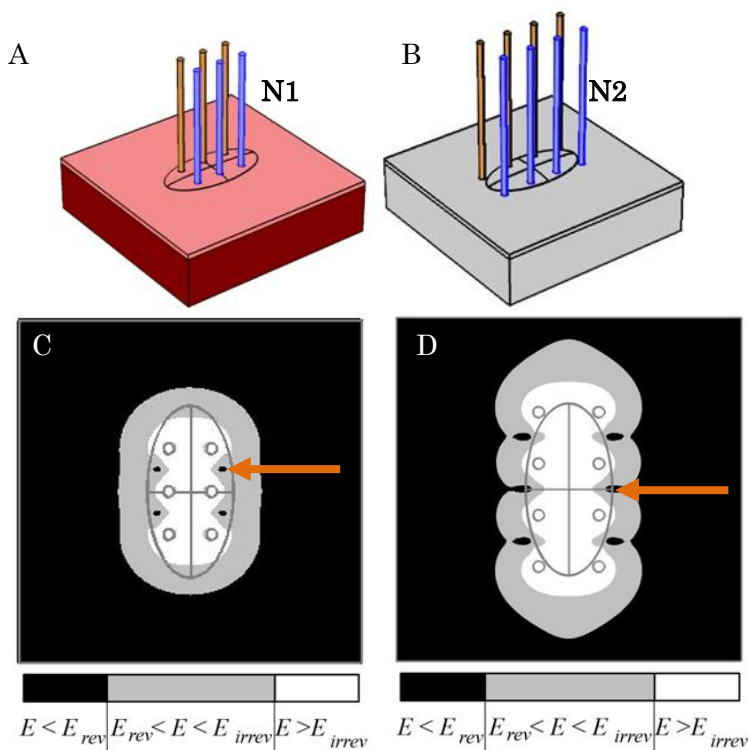


Figura 16 - Distribuição de campo para modelo geométrico dos eletrodos (A) N1 e (B) N2 posicionados no centro do tumor. Plano XY da distribuição de campo elétrico em modelo de tumor elipsoidal superficial por eletrodos (C) N1 e (D) N2 com campo elétrico aplicado de 1500 V/cm. As setas indicam pontos críticos onde não há campo elétrico superior ao limiar de eletroporação reversível.

A Figura 16 mostra o resultado da simulação para os eletrodos N1 e N2 no modelo de tumor elipsoidal na superfície da pele. Pode-se observar, nos pontos indicados com seta, que não é possível tratar o tumor com uma única aplicação central. Os pontos pretos no meio da estrutura significam que não há campo elétrico suficiente para eletroporar células que estejam nesta região. Numa primeira abordagem, buscou-se nos experimentos a realização da aplicação elétrica uma única vez. Em aplicações clínicas, diversos reposicionamentos do eletrodo podem ser feitos, além de múltiplas sessões (MIR *et al.*, 2006), (QUAGLINO *et al.*, 2008) e (MATTHIESSEN *et al.*, 2012). Todavia, procedimentos múltiplos são de difícil representação através de simulação. Ainda assim, algumas variações no posicionamento dos eletrodos e na polaridade das agulhas foram analisadas na seção seguinte.

#### **4.4 Variações dos eletrodos N1 e N2**

A partir do que foi demonstrado na seção anterior, foi realizado uma nova abordagem para os resultados nesta seção. Optou-se por variar o local de inserção das agulhas na pele. Como não foi possível eletroporar todo o tumor numa única aplicação, foi proposto um posicionamento capaz de eletroporar todo o volume em duas aplicações. A seguir, a Figura 17A apresenta a posição das agulhas, cercando metade do tumor, na direção longitudinal do tumor. Na Figura 17B é possível observar que o eletrodo N2 apresenta dimensões que favorecem o tratamento em duas aplicações.

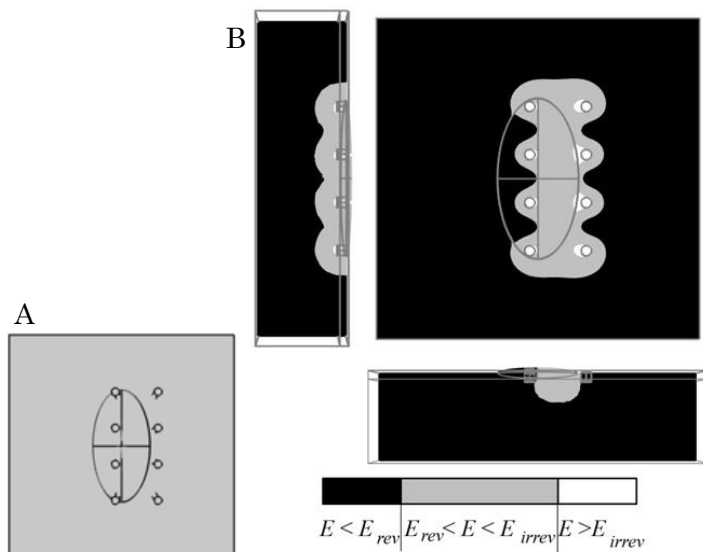


Figura 17 - Aplicação com eletrodo N2 em metade do tumor. (A) Representa o posicionamento do eletrodo paralelo ao maior diâmetro do tumor. (B) Distribuição de campo cobrindo completamente metade do volume tumoral com campo suficiente para eletroporar e matar o tecido alvo.

Além do posicionamento do eletrodo, foi proposta a variação na polaridade da tensão aplicada nas agulhas. A Figura 18A apresenta a polaridade com a qual os pulsos foram aplicados na estrutura. Na Figura 18B é mostrado o corte no plano XY, pelo centro do tumor, da distribuição de campo elétrico nos tecidos. Nesta figura, as setas estão indicando pontos no quais o campo elétrico local é insuficiente para abertura de poros nas células. É interessante reparar que os recuos de campo (ou prolongamentos da área preta) se dão justamente entre as agulhas de mesma polaridade. Enquanto no espaço entre as agulhas com polaridades opostas a situação se inverte, havendo uma expansão do campo suficiente para eletroporação.

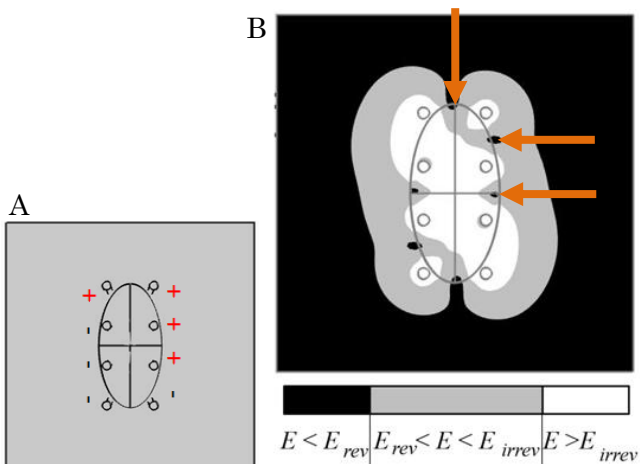


Figura 18 - Corte no plano XY de modelo de pele e tumor com eletrodo de dimensões N2. (A) polaridade aplicada às agulhas. (B) Distribuição de campo nos tecidos. As setas indicam alguns pontos sem campo suficiente para eletroporação.

Devido às pequenas dimensões do eletrodo N1, diversas aplicações deveriam ser feitas a fim de eletroporar completamente o tumor. Tais simulações não foram executadas por fugir do critério, por nós definido, de procurar por arranjos e polaridades de eletrodos que permitam tratamento com uma única aplicação.

#### 4.5 Variações do eletrodo N3

Nesta seção são apresentados os resultados de variações feitas no eletrodo N3. Semelhante ao que foi apresentado na seção anterior (4.4), neste conjunto de simulações foram realizadas modificações estruturais no eletrodo, a partir do conhecido formato N3. A primeira subseção (4.5.2) apresenta um reposicionamento do eletrodo. A seguir, na subseção 4.5.2, foram realizadas alterações na polaridade da tensão nas agulhas. A terceira subseção (4.5.3) agrupa resultados da variação na distância entre as duas linhas de agulhas – distância entre agulhas de um par. Na seção 4.5.4 são apresentadas as variações feitas no espaço entre agulhas de uma mesma linha – distância entre os pares de agulhas. Por fim, o resultado da junção dos melhores resultados encontrados em cada uma das seções anteriores é compilado num único modelo e o resultado é mostrado na subseção 4.5.5.

#### 4.5.1 Reposicionamento do eletrodo

Neste experimento foi proposta a alteração do local de inserção das agulhas com relação ao tumor. Um par de agulhas foi inserido exatamente ao redor do maior diâmetro do tumor no eixo Y. Na Figura 19A está representado o corte no plano XY demonstrando o posicionamento do eletrodo. A seta na Figura 19B indica a região na qual foi feito o corte no plano YZ.

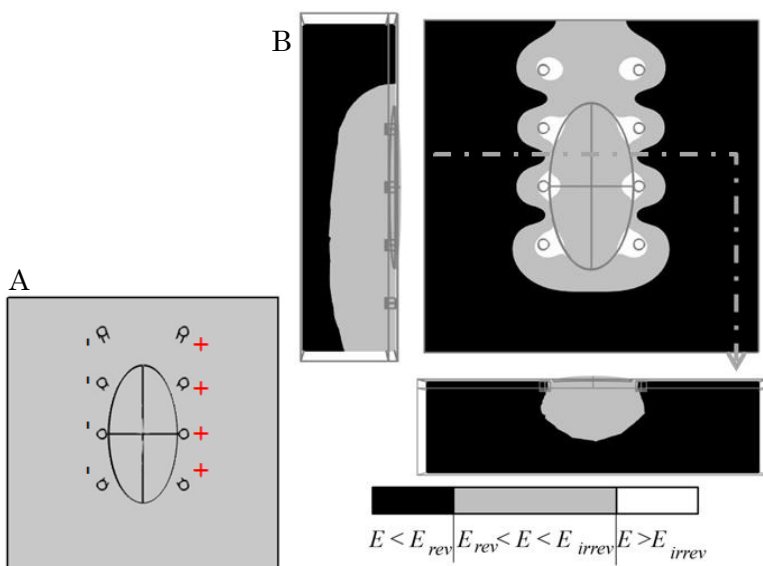


Figura 19 - Alteração na posição do eletrodo com relação ao tumor. (A) Plano XY da modificação geométrica e a polaridade aplicada no experimento. (B) Distribuição de campo nos planos XY, YZ e ZX para 1025 V aplicados.

#### 4.5.2 Variação na polaridade das agulhas

Foram avaliadas duas alterações na polaridade das agulhas. Na simulação, os sinais de menos representam os terminais de referência (terra) e os sinais positivos representam os terminais de fase. Nesta situação, a terminologia pares de agulha (uma positiva e a em oposição, negativa) não representam mais o mesmo posicionamento geométrico

que nas seções anteriores, por esta razão, doravante serão empregados apenas os termos:

- Distância entre linhas de agulhas –  $D_L$
- Distância entre agulhas na mesma linha –  $D_A$

Na Figura 20, são apresentados dois cortes no plano XY com a indicação de duas polaridades avaliadas. Este arranjo de agulhas apresenta duas linhas de agulhas, com quatro agulhas em cada linha. O resultado da simulação dos painéis A e B da Figura 20 são apresentados nos painéis D e E.

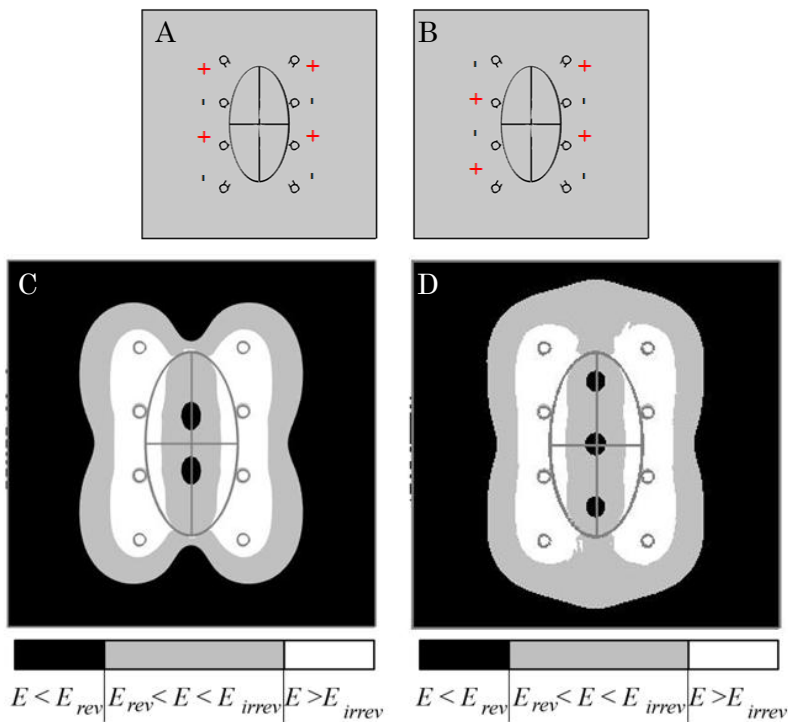


Figura 20 - Variações na polarização do eletrodo N3. A polaridade do pulso de tensão aplicada às agulhas para (C) foi (A) e para (D) foi (B). O potencial elétrico aplicado foi 1500 V.

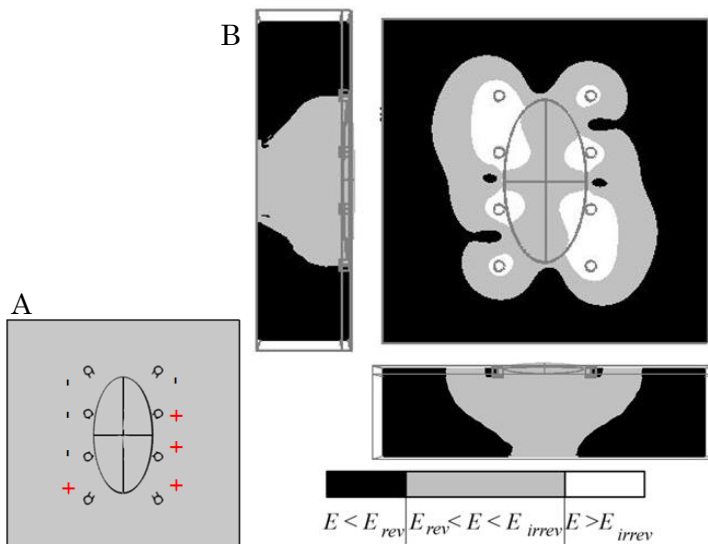


Figura 21 - Distribuição de campo para polaridade apresentada em (A). Potencial aplicado de 1450V. O campo elétrico entre agulhas não é homogêneo, mas, capaz de eletroporar todo o volume tumoral.

A polarização dos painéis A e B da Figura 20 não gerou campo suficiente para eletroporar todo o tumor, mesmo elevando o potencial aplicado a 1500 V. Como observado na Figura 20, o campo elétrico fechou-se nas laterais do tumor, não havendo cobertura de campo no centro do tumor.

Para a polarização da Figura 21 foi possível obter uma distribuição de campo suficientemente alta para eletroporar todo o tumor, como mostrado na Figura 21. É possível notar que as agulhas centrais na Figura 21 apresentam o mesmo problema causado pelo recuo de campo visto na Figura 16B e na Figura 15.

#### 4.5.3 Variação na distância entre linhas de agulhas

Na Figura 22 é apresentada a polarização aplicada no experimento. Foram realizados acréscimos na distância original, em cada experimento aumentou-se  $D_L$  em 2 mm. O resultado do painel A é mostrado em C e para a B no painel D da Figura 22. O valor mínimo de tensão para estas configurações foi 1000 V e 925 V.

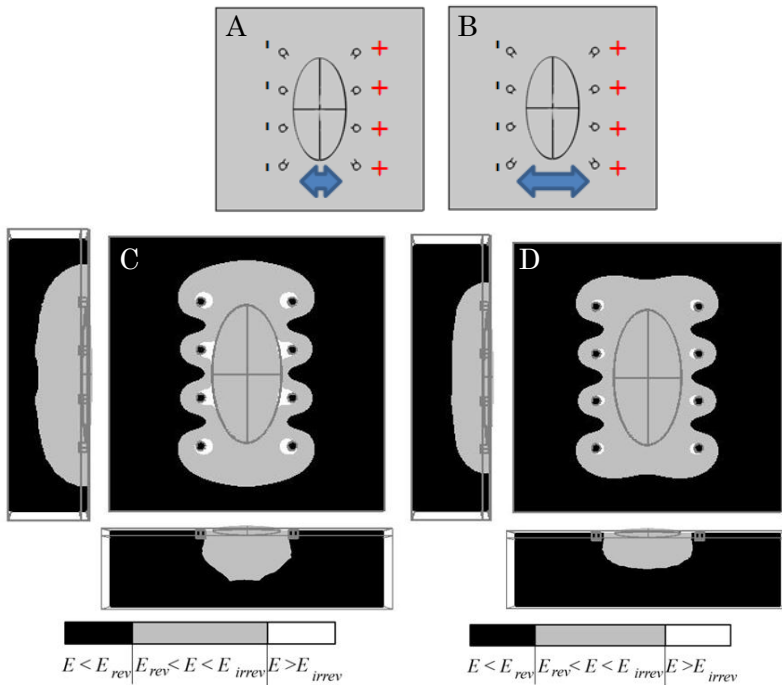


Figura 22 - Variação na distância entre linha,  $D_L$ . (A) e (C) Acréscimo de 2 mm na distância original, 1000 V. (B) e (D) Acréscimo de 4 mm,  $D_L = 14$  mm, 925 V.

Um terceiro experimento foi realizado com  $D_L = 16$  mm. Este resultou num potencial mínimo aplicado de 1025 V.

#### 4.5.4 Variação na distância entre agulhas na mesma linha

A seta na Figura 23A indica a direção na qual foi variada a distância entre agulhas. Os painéis B e C da Figura 23 apresentam o resultado da distribuição de campo para acréscimo e redução de 10% em  $D_A$ , respectivamente. O mínimo potencial elétrico aplicado determinado para estes experimentos foram 1225 V para  $D_A$  aumentada e 1075 V para reduzida.



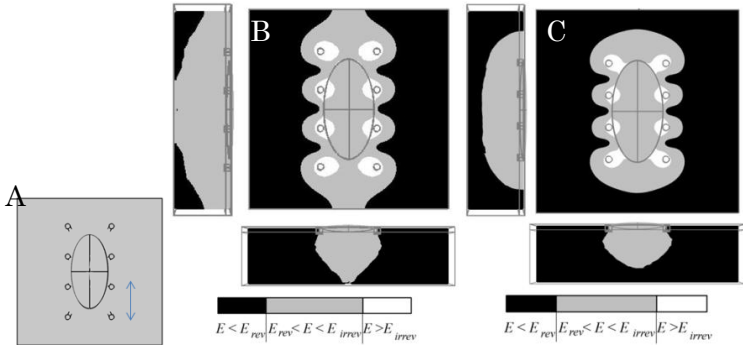


Figura 23 - Resultado da alteração de 10% na distância entre as agulhas na mesma linha,  $D_A$ . A seta em (A) representa a direção das modificações. (B) Aumento de 10% na distância original de 7 mm. (C) 90% da distância original.

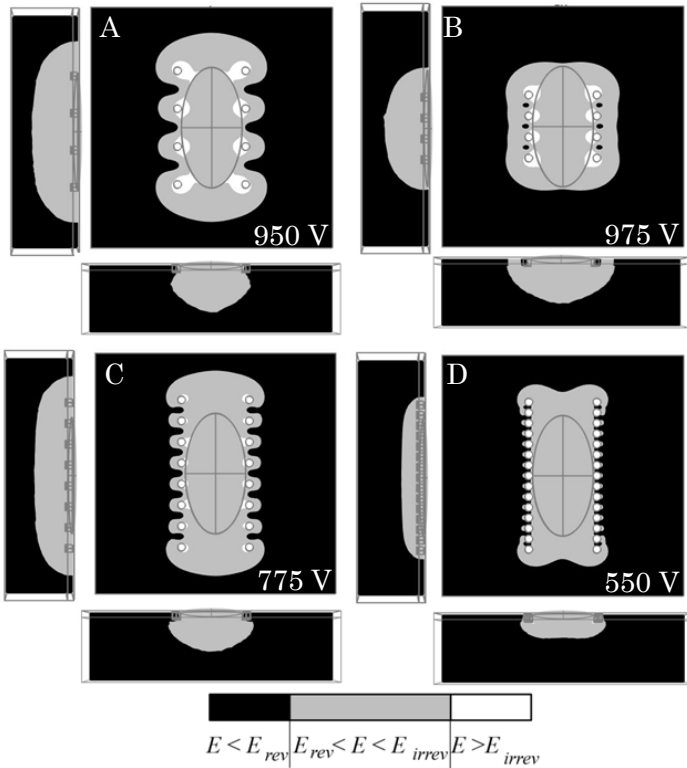


Figura 24 - Campo elétrico local para três diferentes reduções no espaçamentos entre agulhas na mesma linha,  $D_A$ . (A) 75% da distância original. (B) e (C)  $D_A = 3,5$  mm, *i.e.* 50% do original, em (C) dobrou do número de agulhas de (B). (D) 25% da distância original, ou seja, redução de 75%.

A Figura 24 agrupa três diferentes reduções de  $D_A$ , 25%, 50% e 75%. O mínimo potencial aplicado necessário para tratamento encontrado foi 950 V, 975 V, 775 V e 550 V. O resultado da Figura 24B sofreu interferência do curto comprimento da linha de agulhas, em relação ao maior diâmetro do tumor. Para poder analisar apenas a influência das variações de  $D_A$ , foi dobrado o número de agulhas. Na Figura 24 estão inseridos 15 pares de agulhas ao todo.

#### 4.5.5 Junção dos melhores resultados individuais

Na TABELA 3 estão agrupados os valores de tensão mínima encontrado para os experimentos apresentados nas seções anteriores. A primeira coluna contém o nome do arranjo experimentado; na segunda é mostrada a seção na qual a topologia foi apresentada; a terceira e quarta colunas apresentam o potencial elétrico mínimo necessário para eletroporar todo o tumor, e o campo elétrico aplicado, respectivamente; na última coluna foi calculado a diferença, em porcentagem, do valor mínimo de cada experimento para o estudo de caso (primeira linha), conforme equação 5.

$$\Delta\% = \frac{(V_{EstudoCaso} - V_{Experimento})}{V_{EstudoCaso}} \cdot 100 \quad (5)$$

A primeira linha da TABELA 3 é referida à topologia de eletrodo e polaridade empregada no estudo de caso, e apresenta o valor mínimo de tensão, como visto na seção 4.2. Observa-se que os melhores resultados para cada conjunto de variações foram deslocamento no eixo x, aumento de 4 mm em  $D_L$  e redução de 50% em  $D_A$ , com reduções de 6,82%, 15,91% e 29,55% na tensão mínima, respectivamente. A união das três modificações resultou no potencial elétrico mínimo de 875 V ( $E_{APLICADO} = 729$  V/cm). A redução de 50% para 25% de  $D_A$  foi desconsiderada por implicar no grande número de agulhas, situação que dificulta a inserção do eletrodo na pele do paciente.

TABELA 3  
RESUMO DOS VALORES MÍNIMOS DE TENSÃO PARA CADA EXPERIMENTO E A PORCENTAGEM DA VARIAÇÃO A PARTIR DO ESTUDO DE CASO

	Seção	Tensão Mínima (V)	Campo Aplicado (V/cm)	$\Delta\%$
N3 (estudo de caso)	4.2	1100	1100	-
Deslocamento eixo-x	4.5.1	1025	1025	-6,82
N3 polarização em L	4.5.2	1450	Não homogêneo	31,82
$D_L + 2\text{ mm}$	4.5.3	1000	833,33	-9,09
$D_L + 4\text{ mm}$	4.5.3	925	660,71	-15,91
$D_L + 6\text{ mm}$	4.5.3	1025	640,62	-6,81
$1,1D_A$	4.5.4	1225	1225	11,36
$0,9D_A$	4.5.4	1075	1075	-2,27
$0,75D_A$	4.5.4	950	950	-13,64
$0,5D_A$ (8 pares)	4.5.4	775	775	-29,55
$0,25D_A$	4.5.4	550	550	-50

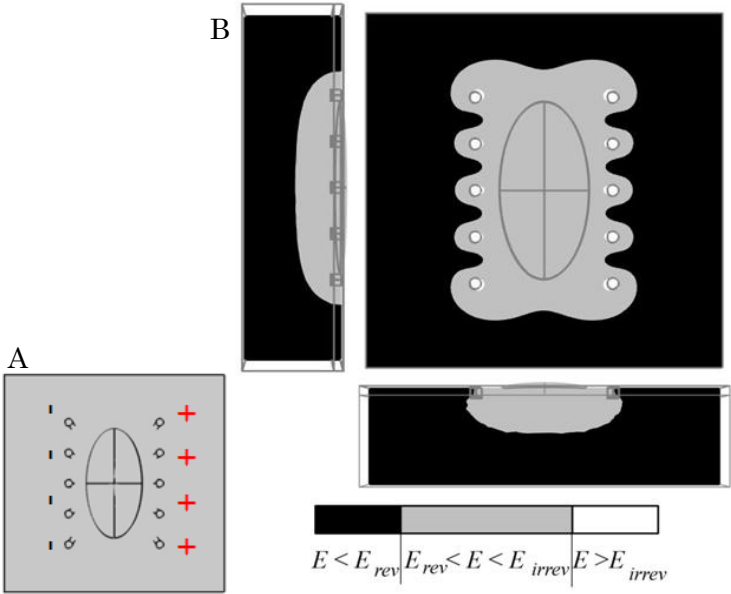


Figura 25 - Experimento considerando três melhores modificações independentes: Deslocamento do eletrodo no eixo X, aumento de 4 mm em  $D_L$  e redução de 50% em  $D_A$ . (A) Geometria e polaridade das agulhas no experimento. (B) Distribuição de campo para tensão mínima de 875 V.

4.6 Redução no volume tumoral

Na Figura 26 está representado o corte no plano XY para seis diferentes volumes de tumor. O painel A mostra o estudo de caso (tensão mínima), enquanto os demais painéis trazem a porcentagem do volume de seus tumores com relação ao volume original (Figura 26A). O valor mínimo de tensão necessário para cada topologia é apresentado na TABELA 4, abaixo.

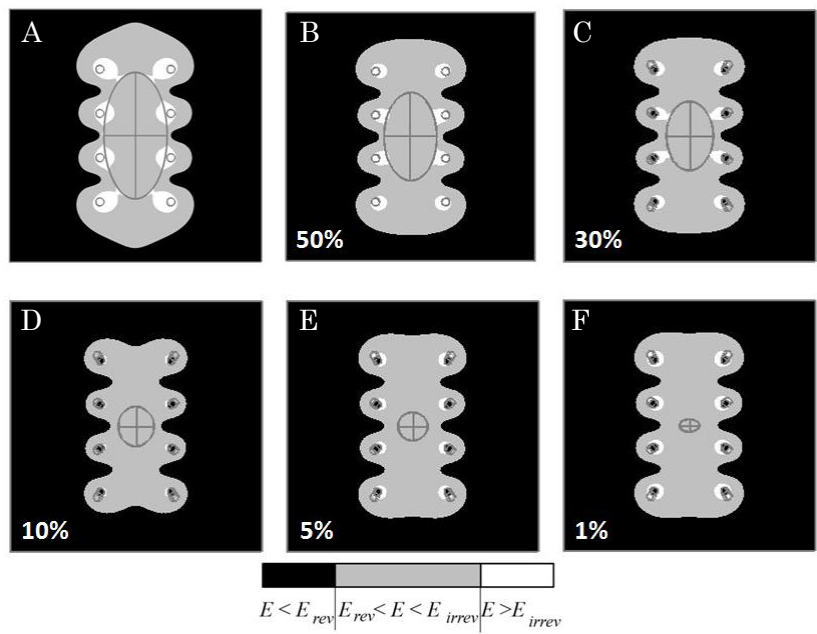


Figura 26 - Corte no plano XY para seis diferentes volumes tumorais. (A) É a estrutura do estudo de caso. O tumor em (F) tem 1% do volume de (A).

TABELA 4  
VALORES MÍNIMOS DE TENSÃO PARA SEIS DIFERENTES VOLUMES DE TUMOR

	A	-	-	B	C	D	E	F
% Vol <sub>0</sub>	100	90	75	50	30	10	5	1
Tensão Mínima (V)	1100	1050	1000	900	875	800	800	850

4.7 Aumento na altura do tumor

Na Figura 27 são apresentados resultados para três diferentes alturas de tumor. A TABELA 5 sumariza as alturas e a tensão mínima. O objetivo deste conjunto de experimentos foi determinar a altura máxima do tumor a partir da qual o tratamento perde efetividade (SUZUKI; MARQUES; RANGEL, 2015). A Figura 27B e a Figura 27C representam a distribuição de campo para as duas últimas colunas da TABELA 5. Para estes experimentos foi necessário reduzir a geometria. O aumento na altura do tumor implica num número expressivo de elementos na malha de cálculo. Na capacidade computacional atual estamos limitados a não mais que 200 mil elementos. Para garantir a exequibilidade da simulação, as pontas da geometria foram retiradas, mantendo apenas a região central da estrutura. Os cortes no plano YZ, apresentados abaixo, estão afastados dos extremos. A distribuição local de campo não deve sofrer influência dos limites da geometria, entretanto, o corte na geometria inseriu detalhe de perspectiva nas imagens. Assim sendo, o círculo no centro dos painéis da Figura 27 devem ser desconsiderados.

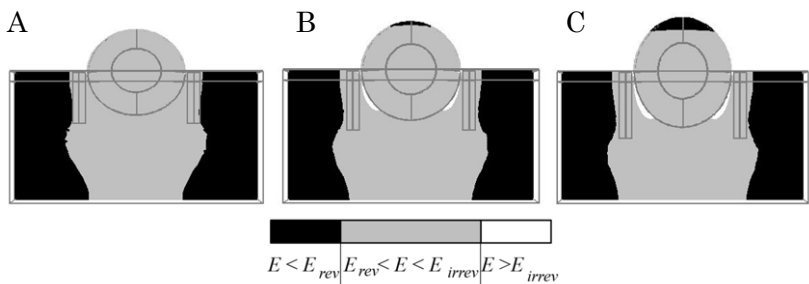


Figura 27 - Limiar de efetividade do tratamento em função da altura do tumor, originalmente 1,25 mm. (A) Aumento de sete vezes na altura do tumor, totalizando 8,75 mm. (B) Primeiro valor simulado a partir do qual o tratamento não é efetivo, altura de 10 mm. (C) Inviabilidade significativa para altura de 11,25 mm.

TABELA 5  
VALORES MÍNIMOS DE TENSÃO PARA DEZ DIFERENTES ALTURAS DE TUMOR

						Figura 27		A	B	C
$\uparrow h_0$	-	10%	75%	110%	150%	3x	6x	7x	8x	9x
$V_{\text{mín}}$ (V)	1100	1100	1125	1100	1075	1000	975	1250	>1500	>1500

#### 4.8 Eletrodo hexagonal e variações

Para tumores superficiais com diâmetro superior a 1 cm é indicado o uso de eletrodos hexagonais, tipo III (MIR et al., 2006). A Figura 28 apresenta o modelo geométrico com tratamento por eletrodo hexagonal. Os painéis B e C mostram a polaridade da tensão aplicada às agulhas. Os resultados da distribuição de campo para estes experimentos estão nos painéis D e E da Figura 28.

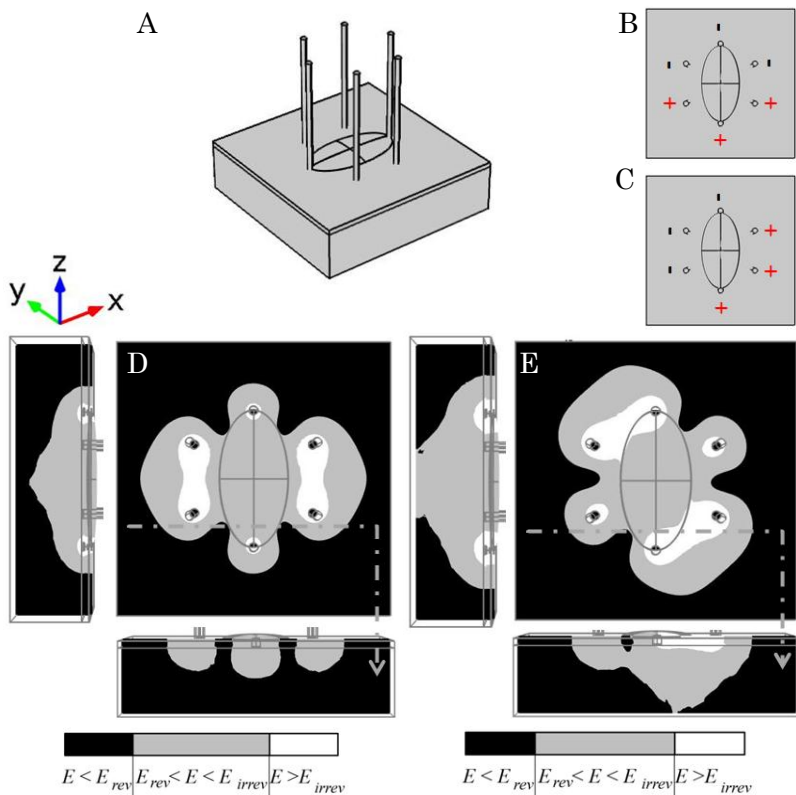


Figura 28 - Aplicação com eletrodo tipo III, hexagonal. (A) Visualização 3D do modelo geométrico. (B) e (C) Polarizações aplicada para obtenção dos resultados em (D) e (E). O potencial mínimo encontrado foi 1275 V e 1425 V. As setas indicam a região na qual foram feitos os cortes no plano YZ.

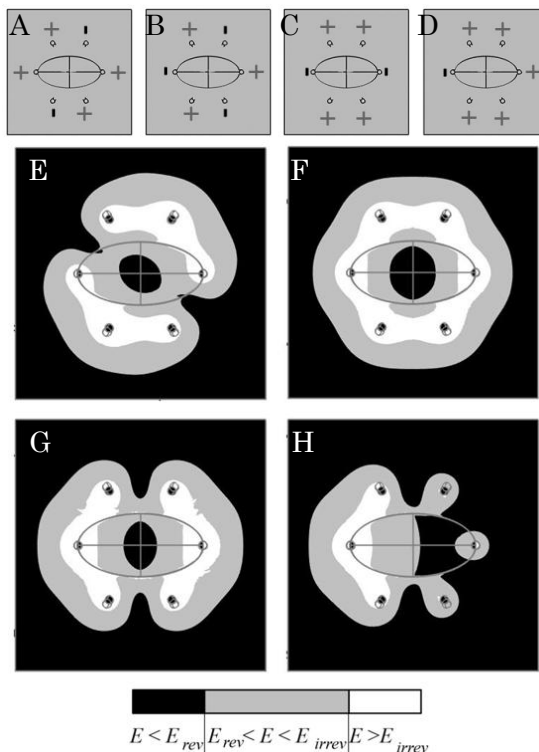


Figura 29 - Quatro diferentes polarizações de tensão aplicadas ao eletrodo tipo III.

As polaridades de (A) a (D) aplicada ao modelo resultando nas distribuições de (E) a (H). Foram aplicados até 1500V sem encontrar um valor capaz de campo capaz de eletroporar todo o volume tumoral.

O potencial elétrico mínimo dos experimentos apresentados nos painéis D e E da Figura 28 foram 1275 V e 1425 V, respectivamente. Nenhum resultou num potencial inferior ao estudo de caso. Outras alterações de polaridade foram propostas e estão agrupadas na Figura 29. Não foi possível encontrar um valor mínimo antes de atingir o campo elétrico de 1500 V/cm.

Foi proposta uma alteração na arquitetura do eletrodo hexagonal. Na Figura 30 é apresentado eletrodo tipo III com adição de uma agulha no centro e com polaridade oposta à das agulhas externas. O potencial elétrico mínimo necessário para eletroporar o volume tumoral é 800 V. A distância entre as agulhas é 10 mm, portanto o campo aplicado foi 800 V/cm. A redução do valor de tensão mínima é, aplicando equação 5, 27,28% com relação ao estudo de caso.

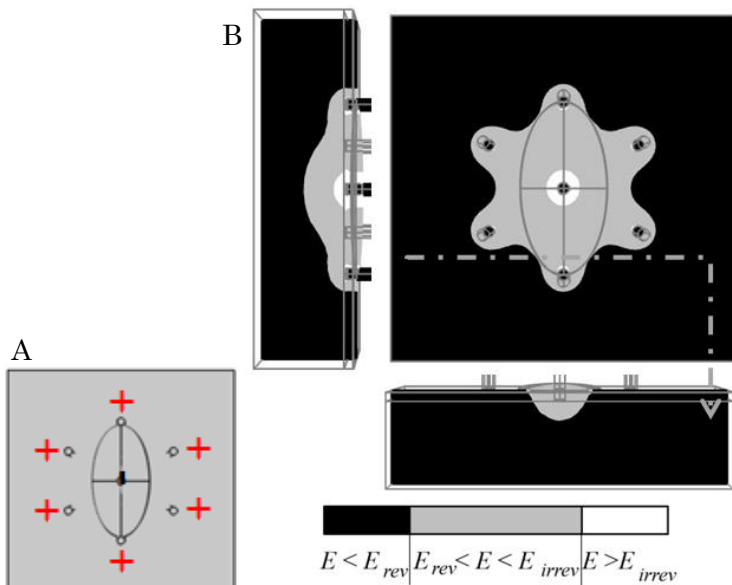


Figura 30 - Eletrodo hexagonal modificado. Inserção da agulha central. (A) Geometria e polaridade utilizada no experimento. (B) Distribuição para o potencial mínimo de 800 V. A seta indica a região na qual foi feito o corte no plano YZ.

#### 4.9 Matriz de agulhas e variações

O limitado tamanho dos eletrodos pode tornar repetitivo o tratamento dos grandes nódulos tumorais. A busca por eletrodos com maior abrangência é contínua (CASTIELLO *et al.*, 2014) e (ONGARO *et al.*, 2015). Nesta seção são apresentados dois arranjos de eletrodos para este fim. Na Figura 31 está um arranjo em forma de matriz com 25 agulhas. As dimensões da pele e do tumor foram mantidas, a distância entre agulhas na mesma linha é 2,5 mm e a distância entre uma linha e outra é de 5 mm (Figura 31A). Foram aplicadas duas polarizações distintas, conforme os painéis B e C da Figura 31. O resultado do cálculo da distribuição de campo é apresentado na Figura 31D e na Figura 31E, respectivamente. O experimento considerou no máximo a tensão de 1000 V, referente ao campo aplicado de 2000 V/cm. Em toda região branca ocorreu eletroporação irreversível, todavia, em diversos pontos entre agulhas não houve campo suficiente para eletroporação.



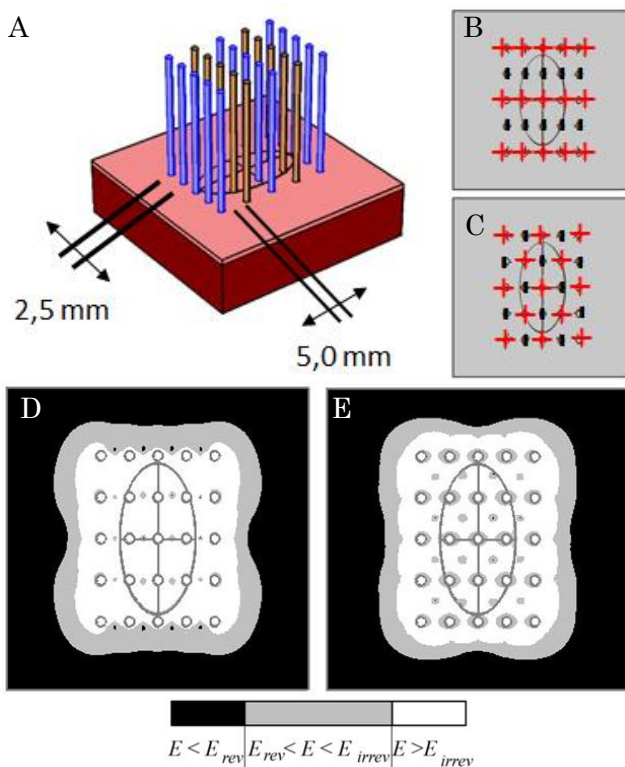


Figura 31 - Eletrodo em matriz com 25 agulhas. (A) Modelo geométrico. (B) e (C) Polarização. (D) e (E) Distribuição para potencial aplicado de 1000 V.

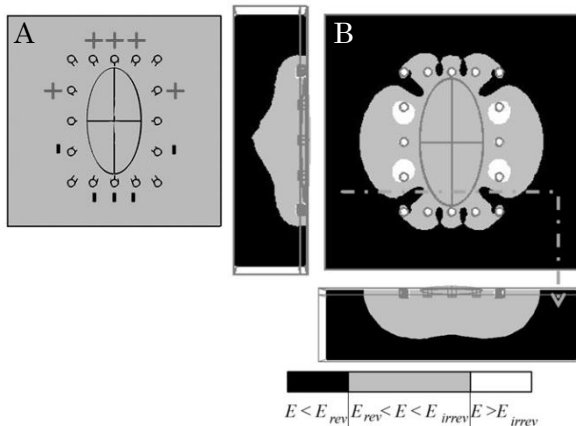


Figura 32 - Modificação do eletrodo em matriz, retiradas as agulhas centrais. (A) Eletrodo de 16 agulhas e sua polarização. (B) Distribuição de campo para 1100 V.



## 5 DISCUSSÃO

A EQT é um tratamento anticâncer que surgiu há menos de vinte anos. Esta técnica uni o efeito das drogas quimioterápicas à ação da eletroporação. Em 2006 foi publicado o Procedimento de Operação Padrão Europeu para uso da Eletroquimioterapia (MIR *et al.*, 2006). Segundo este protocolo padrão, é recomendado o uso de eletrodo tipo I (placas paralelas) para tratamento de nódulos tumorais pequenos e superficiais. Tal eletrodo é composto por duas placas que devem ser postas em torno do tumor para aplicação dos pulsos. O reposicionamento das placas implica na medição da distância entre placas e o cálculo do potencial elétrico necessário para aplicação (REBERSEK *et al.*, 2008). No ESOPE é ainda recomendado o uso de eletrodo de agulhas para tumores grandes e profundos. Porém, o uso dos eletrodos de agulhas tornou-se amplo pela praticidade de manuseio frente aos eletrodos de placas. Mesmo com o desenvolvimento de eletrodos comerciais de tamanho fixo, o emprego das placas ainda é compartilhado com agulhas (BYRNE *et al.*, 2005), (CURATOLO *et al.*, 2012), (MALI *et al.*, 2013) e (CAMPANA *et al.*, 2014). Um problema inerente a esta substituição é o aumento das chances de o campo elétrico não ser suficiente para eletroporar todo o volume tumoral. Em 2008 foi mostrada a importância de apertar as placas contra o tumor, para aumentar o contato tumor-eletrodo (COROVIC *et al.*, 2008). Logo, a praticidade alcançada com a padronização do espaço entre placas dos eletrodos tipo I restringe o tamanho dos tumores que podem ser tratados pelo mesmo. Por outro lado, o uso de eletrodos de agulha é indicado apenas para nódulos com maior diâmetro (MIR *et al.*, 2006). Neste trabalho foram avaliadas as implicações do uso de eletrodos de agulha (tipos II e III), quanto à distribuição de campo elétrico, no tratamento por EQT de nódulos tumorais superficiais e de diferentes tamanhos.

O conjunto de experimentos exposto neste trabalho buscou determinar sempre o menor potencial elétrico necessário para preservar a efetividade do tratamento. Este critério foi considerado importante por refletir a robustez do arranjo (posição e polaridade das agulhas) frente a quedas de tensão no sistema e demasiada distância entre eletrodos e tumor.

Abaixo será discutido cada resultado apresentado acima (seção 4). Todavia, podemos salientar alguns em específico. Através das simulações realizadas, podemos observar a importância de preservar um espaço (de tecido não afetado) entre as agulhas e a massa tumoral. Este

resultado é contrário ao observado no caso de eletrodos de placas paralelas, nos quais é recomendado que se pressione a massa tumoral entre os eletrodos (COROVIC *et al.*, 2008). Porém, nosso resultado está de acordo com o obtido, automaticamente, por uma rede neural treinada para determinar o melhor posicionamento dos eletrodos (COROVIC; ZUPANIC; MIKLAVCIC, 2008) e (ŽUPANIČ; ČOROVIC; MIKLAVČIČ, 2008). Esta distância deve ser mantida, pois o recuo do campo entre agulhas de mesma polaridade pode afetar a distribuição de campo no tumor (Figura 15 e seção 4.5.3). Outro resultado, ainda na questão de posicionamento dos eletrodos, é quanto ao ganho obtido ao inserir um par de agulhas exatamente na extremidade do maior diâmetro (seção 4.5.1). Esta pequena alteração na posição das agulhas promove a redução em 7% da tensão mínima, como reportamos em (BERKENBROCK; RANGEL; SUZUKI, 2016).

Para avaliar as possíveis perdas de efetividade do tratamento pelo uso de eletrodos de agulhas, é importante conhecer o padrão de distribuição de campo obtido com uso dos eletrodos de placas. Na seção 4.1 foi apresentada a Figura 12 que representa a distribuição de campo elétrico para o eletrodo de placas paralelas submetidas a uma diferença de potencial elétrico de 1300 V. Todo o tumor está completamente imerso em campo elétrico local superior ao limiar de eletroporação, portanto, todas as células, tumorais ou não, sofrerão o fenômeno da abertura de poros em suas membranas plasmáticas (KINOSITA; TSONG, 1977), (GOWRISHANKAR; WEAVER, 2003) e (MIKLAVCIC *et al.*, 2006a). Se houver no local uma quantidade suficiente de drogas quimioterápicas, como bleomicina e cisplatina, estes agentes se deslocarão por difusão através dos poros e levarão as células em divisão à morte por apoptose (MIR; BANOUN; PAOLETTI, 1988) e (MIR, 2000). Em seguida, na Figura 13 foi apresentada a distribuição de campo para o mínimo potencial elétrico necessário a ser aplicado entre as placas. Potencial esse definido como suficiente para eletroporação das células tumorais. A tensão mínima foi de 750 V, isto é, um valor de tensão mais de 40% menor que o valor aplicado para este tipo de tratamento. A corrente total calculada para 1300 V foi 1,74 A e para 750 V foi 0,32 A. Estes dois resultados permitem uma análise quanto à robustez do eletrodo frente a não idealidades na fonte de tensão (BRANDISKY; DASKALOV, 1999). Limitações na capacidade da fonte de alta tensão, relacionadas com a diferença entre correntes de carga e descarga dos capacitores, resulta na queda de tensão no pulso de saída (PUC *et al.*, 2004). Espera-se que a fonte de alimentação seja capaz de suprir os 2 A necessários para o tratamento, contudo, mesmo

uma redução de mais de 5 vezes na corrente (e 40% na tensão) ainda resultaria numa aplicação efetiva da EQT. As simulações apresentadas neste trabalho mostram não apenas se o eletrodo é efetivo em gerar um campo adequado por todo volume tumoral, mas também, o quão robusto é o eletrodo para quedas de tensão na alimentação.

O resultado da simulação do estudo de caso é mostrado na Figura 14, e a corrente total foi de 0,39 A. Na Figura 15 está a distribuição de campo para a tensão mínima, 1100 V e corrente total de 0,24 A. A redução na tensão aplicada foi de 15%. Portanto, este eletrodo – oito agulhas alinhadas em duas linhas paralelas, chamado tipo II – é menos robusto à queda de tensão do que o eletrodo de placas paralelas, tipo I. Todavia, as vantagens atribuídas ao eletrodo de agulha como praticidade de reposicionamento e aprofundamento do campo permanecem válidas (GILBERT; JAROSZESKI; HELLER, 1997) e (REBERSEK *et al.*, 2008). A possibilidade de inserção do eletrodo na pele permite que o campo elétrico alcance mais camadas subcutâneas. Por esta razão o ESOPE sugere o uso de eletrodos de agulhas para tumores profundos (MIR *et al.*, 2006), e trabalhos reforçam que os eletrodos devem ser inseridos mais profundamente do que a mais profunda porção do nódulo tumoral (COROVIC; ZUPANIC; MIKLAVCIC, 2008) e (ŽUPANIČ; ČOROVIC; MIKLAVČIČ, 2008). Lembrando que além dos exames por imagem como ultrassom e ressonância magnética, é possível estimar a profundidade do tumor através das equações 3 e 4. A robustez do eletrodo de placas pode contrabalançar o fato deste eletrodo drenar mais corrente do que os eletrodos de agulhas. Nos experimentos apresentados na Figura 12 e Figura 14 observamos que a corrente drenada pelo eletrodo de placas é 4,5 vezes aquela drenada com eletrodo de agulhas. Podemos supor que há menor chance de ocorrer quedas de tensão durante aplicação quando o eletrodo drena menos corrente da fonte de alimentação, sendo, portanto, o eletrodo de agulha menos susceptível a causar estas quedas. Esta diferença entre corrente drenada por diferentes tipos de eletrodo é conhecida (BRANDISKY; DASKALOV, 1999). Podendo ser observada também em trabalhos que utilizam gel sobre o tumor para aplicação dos pulsos (IVORRA *et al.*, 2008) e (SUZUKI; MARQUES; RANGEL, 2015).

Dois outros eletrodos estavam disponíveis ao veterinário para aplicação dos pulsos. Na subseção 4.3 são agrupados os resultados para os eletrodos N1 e N2. A Figura 16 mostra que nenhum dos dois eletrodos seria adequado para tratar este tumor numa única aplicação. A seguir, na subseção 4.4 são apresentadas variações na polaridade das agulhas e no posicionamento do eletrodo sobre o tumor, a fim de obter

um tratamento efetivo. Alguns experimentos mostraram incapacidade de tratamento, e são apresentados nas Figura 16 e Figura 18. Através destes é possível observar que nem mesmo a aplicação de 1500 V entre polos foi suficiente para cobrir todo o tumor. Em especial, os pontos entre agulhas de mesma polaridade se mostram como as regiões mais críticas. Dos experimentos realizados, obtemos apenas um resultado positivo que é mostrado na Figura 17. Nesta simulação, foi considerado um tratamento com duas aplicações. Observamos que seria possível aplicar os pulsos numa metade longitudinal do tumor, cobrindo-a completamente. Outra aplicação seria suficiente para cobrir a outra metade. Segundo nossos experimentos, outros posicionamentos requereriam mais de duas aplicações. Mais de uma aplicação por paciente ou mais de uma sessão de EQT podem ser necessárias (MIR *et al.*, 2006), (QUAGLINO *et al.*, 2008) e (MATTHIESSEN *et al.*, 2012). Contudo, neste trabalho, o número máximo de aplicações foi restringido em dois. Essa decisão foi tomada por considerarmos onerosa a realização de diversas aplicações com eletrodos pequenos (CAMPANA *et al.*, 2009). Principalmente quando tendo à disposição eletrodos maiores. Tem-se buscado eletrodos com maior abrangência a fim de tratar grandes nódulos tumorais (CASTIELLO *et al.*, 2014). Com base nisto, optamos em reduzir o número de simulações que avaliassem múltiplas aplicações por nódulo, focando nossos experimentos na busca por eletrodos mais robustos e abrangentes. O termo “abrangente” aqui utilizado refere-se ao volume tumoral coberto por campo elétrico capaz de induzir eletroporação.

O eletrodo utilizado especificamente no estudo de caso é por vezes referenciado como N3. Experimentos *in silico* foram realizados modificando a polaridade e posicionamento das agulhas, e ainda, as distâncias entre agulhas na mesma linha,  $D_A$ ; e entre linhas,  $D_L$ . Os resultados foram apresentados na subseção 4.5, e resumidamente os dados estão compilados na TABELA 3.

O reposicionamento do eletrodo foi testado e o resultado está na Figura 19. A partir das simulações anteriores, hipotetizamos que inserindo um par de agulhas no maior comprimento ao longo do eixo X aumentaria a distância entre tumor e as bordas de campo. O resultado mostrou, que como previsto, a tensão mínima obtida foi 1025 V. Este experimento permite concluir que o simples reposicionamento do eletrodo em alguns milímetros resultou na redução de quase 7% do valor mínimo. Além disto, o experimento permitiu que sustentássemos a hipótese de que o recuo de campo entre agulhas de mesma polaridade pode desempenhar papel significativo na efetividade do tratamento.

Três diferentes formas de polarizar as oito agulhas são sugeridas na Figura 20 e Figura 21. Apenas a polarização da Figura 21 resultou num campo efetivo. Nas demais, mesmo para 1500 V surgiram grandes áreas centrais sem campo suficiente para eletroporação. A proximidade entre agulhas com polaridades opostas fechou a circulação de corrente em pequenos volumes, não envolvendo o meio do tumor com campo reversível.

Na distância entre linhas de agulhas,  $D_L$ , foram adicionados 2 mm, 4 mm e 6 mm. Na Figura 22 são apresentados os resultados para acréscimo de 2 mm e 4 mm à  $D_L$ . A tensão mínima foi, respectivamente, 1000 V e 925 V. Para  $D_L = 16$  mm a tensão mínima foi 1025 V. Além de corroborar nossa hipótese da necessidade de preservar uma distância entre tumor e agulhas, a Figura 22D apresenta distribuição homogênea de campo, o que é interessante. A homogeneidade do campo é importante por significar que a maior parte das células está submetida relativamente à mesma magnitude de campo, livre de extremos (GEHL et al., 1999), (IVORRA *et al.*, 2008), (JIANG; DAVALOS; BISCHOF, 2015) e (KOTNIK *et al.*, 2015). O campo elétrico é inversamente proporcional à distância entre eletrodos. Para  $D_L = 12$  mm e 14 mm, o aumento nesta distância foi contrabalançado pelo afastamento dos pontos críticos. Isto é, foi possível reduzir a tensão aplicada mesmo aumentando a distância, e ainda assim, obter um tratamento efetivo. A partir de  $D_L = 16$  mm, a distância entre os eletrodos passou a interferir mais na efetividade do que o recuo do campo no espaço entre agulhas e tumor.

O processo de determinação da menor tensão necessária para eletroporação foi realizado independentemente para cada um dos planos. Isto é, para cada um dos três planos ortogonais do espaço foi determinada a menor tensão. Tais dados não foram inseridos neste texto, mas foram importantes para entendimento de fenômenos como o indicado pelas setas na Figura 15. Há uma diferença de 350 V entre as tensões mínimas para placas e agulhas paralelas. O limite de tensão, no eletrodo de placas foi imposto pelo plano ZX, enquanto para agulhas, pelo plano YZ. No primeiro caso, foi a distância entre eletrodos de polaridades opostas e espreadimento na ponta dos eletrodos que impôs o limite na redução da tensão. Para o eletrodo de agulhas, o limite foi imposto pela proximidade das agulhas de mesma polaridade e destas com o tumor. Na Figura 15 se observa que as setas indicam dois pontos no tumor onde o campo elétrico local é muito inferior aos demais. É justamente este o corte que apresenta a distribuição de campo mais crítica. O recuo que o campo desenvolve por consequência de as agulhas

terem mesma polaridade põe em risco a efetividade do tratamento nestes pontos. Interessantemente, este resultado leva a uma postura contrária a adotada quando empregados os eletrodos de placas. Čorović demonstra que ao utilizar eletrodos tipo I deve-se espremer os eletrodos contra o tumor (ČOROVIC *et al.*, 2008). Os resultados apresentados na subseção 4.5.3 mostram que aumentar o espaço entre as linhas paralelas implica na redução da tensão mínima. Na Figura 22 se observa que para uma distância entre linhas 4 mm maior que o original resulta numa tensão mínima de 925 V. Este valor representa uma redução de 16% da tensão mínima obtida para eletrodo original, e mais de 30% em relação ao estudo de caso. Se esta porcentagem puder ser considerada como um indicador de robustez do eletrodo contra quedas de tensão, o eletrodo da Figura 22B é mais robusto que o eletrodo original, mas ainda assim, menos robusto que placas (redução de 40% da tensão aplicada no estudo de caso, 1300 V). Logicamente, aumento na distância entre eletrodos implica na redução do campo aplicado. No ESOPE é sugerido que para eletrodo de agulhas seja aplicado campo de 1000 V/cm (MIR *et al.*, 2006). Nesta simulação, o campo aplicado é 750 V/cm. Todavia, é possível dizer que os resultados apresentados por outros grupos corroboram nossa hipótese de que as agulhas devem estar a certa distância das bordas do tumor (ČOROVIC; ZUPANIC; MIKLAVČIC, 2008) e (ŽUPANIČ; ČOROVIĆ; MIKLAVČIČ, 2008). Nestes dois trabalhos, os autores definiram parâmetros para que uma rede neural determinasse a melhor posição para os eletrodos, dado um modelo de tumor. Este resultado foi discutido previamente (BERKENBROCK; RANGEL; SUZUKI, 2016). Porém, devemos considerar ainda que eletrodos de placas drenam mais corrente que eletrodos de agulhas. Deste modo, o arranjo apresentado na Figura 22B, que drenou uma corrente de 0,13 A, pode ser considerado, dentre os analisados até aqui, o mais adequado para o tratamento de tumores elipsoidais cutâneos.

Em seguida, na subseção 4.5.4, são apresentados experimentos nos quais foram alteradas as distâncias entre agulhas na mesma linha,  $D_A$ . Na Figura 23 é apresentada a variação em 10% de  $D_A$ , para mais e para menos. As tensões mínimas obtidas foram 1225 V e 1075 V, respectivamente. Lembrando que no estudo de caso tínhamos 1100 V, portanto, a redução em 10% de  $D_A$  implicou numa diminuição de 2% da tensão mínima. O decréscimo em  $D_A$  reduz o comprimento total da linha de agulhas, para evitar influência do espreadimento nas pontas do eletrodo (eixo Y) foram adicionados mais pares de agulhas. O objetivo deste grupo de simulações era exclusivamente determinar a influência de  $D_A$  na tensão mínima. Nota-se a importância de adicionar as agulhas



extras ao comparar a Figura 24B com a Figura 24C. Ambas têm  $D_A = 3,5$  mm, mas a adição de agulhas reduziu a tensão mínima de 975 V para 775 V. O eletrodo tipo II (agulhas paralelas) se aproxima do tipo I (placas) à medida que  $D_A$  é reduzida e mais agulhas inseridas. E isto pode ser verificado com a aproximação do valor de tensão mínima obtido para Figura 24E e para placas. Para o primeiro caso obtivemos uma tensão de 775 V e para placas de 750 V. É interessante reparar no resultado da Figura 24D, 550 V (27% menor que a tensão mínima para placas). Este valor de 550 V representa uma redução de 58% do valor aplicado no estudo de caso. Sem dúvida seria o eletrodo mais robusto de todos aqui avaliados, todavia, o elevado número de agulhas (30 ao todo) pode tornar a inserção das mesmas no tecido uma atividade exaustiva. Além disso, é possível que se as placas fossem mais compridas (eixo Y) obteríamos resultado semelhante, mas tal hipótese não foi testada.

Nas subseções 4.6 e 4.7 foram avaliadas alterações na geometria do tumor. Nesta foram feitos incrementos na altura do elipsoide, enquanto naquela foi reduzido o volume do nódulo tumoral. Optou-se primeiramente por investigar a redução do volume por se tratar da grandeza levada em conta no cálculo da quantidade de quimioterápico a ser aplicada (MIR *et al.*, 2006). Dentre outros resultados, esperávamos obter mais evidências quanto à importância do espaço tumor-eletrodo. O experimento, no entanto, teve reduções pouco acentuadas no eixo X, suavizando a redução da tensão mínima. Ainda assim, pode-se observar que para um tumor com 10% do volume original, a tensão mínima foi de 800 V. Isto representa um decréscimo de 38% do estudo de caso. Porém, o resultado amplo é o mais significativo. O volume do tumor estudado é aproximadamente  $1 \text{ cm}^3$ , nódulos inferiores a  $0,5 \text{ cm}^3$  podem ser considerados pequenos (MARTY *et al.*, 2006). Com esta série de simulações é possível observar que mesmo para um tumor pequeno ( $\approx 10 \text{ mm}^3$ , 1% do volume original) o tratamento mantém-se efetivo. Alguns estudos sugerem preocupação sobre tratamento de tumores com diâmetro inferior a 4 mm ou superior a 3 cm (SERSA; CEMAZAR, 2003), (LARKIN *et al.*, 2007), (MIKLAVCIC *et al.*, 2010) e (MATTHIESSEN *et al.*, 2012). Neste caso, com diâmetro de 2,7 mm observamos total cobertura com campo suficiente para eletroporação. Por outro lado, o aumento da altura do tumor resultou em pouca alteração da tensão mínima (TABELA 5), mas corroborou a atual preocupação com impossibilidade de tratar nódulos protuberantes (CAMPANA *et al.*, 2009), (NEVES *et al.*, 2014), (SUZUKI *et al.*, 2015) e (SUZUKI; MARQUES; RANGEL, 2015). Foi necessário aumentar significativamente a altura do tumor para explicitar possíveis falhas no

tratamento. O diâmetro original do tumor era de 1,25 mm no eixo Z (altura). A altura tornou-se significativa na inviabilidade do tratamento quando superou seis vezes o valor original. Na Figura 27A se observa que a partir de sete vezes o diâmetro original (8,75 mm), o tumor não é coberto por campo suficiente para eletroporação. A altura de tumor acima da superfície da pele é representada pelo raio de 4,38 mm neste experimento. Este comportamento é similar ao obtido previamente por nosso grupo, no qual, para outra geometria de tumor, foi observada inviabilidade para um tumor 3 mm mais alto que a superfície da pele (SUZUKI; MARQUES; RANGEL, 2015). Uma solução para este problema foi apontada por Suzuki (2015) com base no uso de géis pouco condutores (0,5 S/m). Cobrir o tumor com esse material facilita a passagem de corrente na ponta superior de nódulos protuberantes, homogeneiza a distribuição de campo e aumenta a robustez do tratamento (IVORRA *et al.*, 2008) e (SUZUKI; MARQUES; RANGEL, 2015).

O terceiro arranjo de agulhas comumente utilizado é o hexagonal, ou tipo III. Este tipo de eletrodo é indicado para tumores com diâmetro superior a 1 cm, segundo o ESOPE (MIR *et al.*, 2006). Neste trabalho foram aplicadas seis diferentes polarizações e seus resultados analisados. Apenas duas polarizações resultaram num tratamento efetivo. A geometria do eletrodo, as polarizações vistas no plano XY e o resultado da destruição nos três cortes no espaço estão na Figura 28. Dentre as duas, no que diz respeito a tensão mínima, o melhor resultado pode ser visto na Figura 28D referente a polaridade da Figura 28B. As tensões mínimas calculadas foram 1275 V e 1425 V. Em nenhum dos dois casos obtivemos um valor de tensão menor que o mínimo para o eletrodo N3, além das distribuições de campo serem menos homogêneas que o estudo de caso. Os quatro experimentos da Figura 29 não mostraram efetividade no tratamento do tumor. Os painéis E, F e G contêm grandes áreas sem campo suficiente para eletroporação no centro do tumor. Com o experimento da Figura 29H esperava-se cobrir metade do tumor, mas isto não ocorreu. A tensão aplicada de 1500 V não foi suficiente para eletroporar todo o volume tumoral, portanto, estes arranjos de agulhas e polarizações não são indicados para um tratamento efetivo. Como discutido em (BERKENBROCK; RANGEL; SUZUKI, 2016), o eletrodo hexagonal também apresentou pior desempenho para tumor esférico ou realístico (COROVIC; ZUPANIC; MIKLAVCIC, 2008) e (ŽUPANIČ; ČOROVIĆ; MIKLAVČIČ, 2008).

A partir dos resultados da Figura 29, foi sugerido que a inserção de uma agulha no centro do tumor solucionaria a distribuição de campo

(REBERSEK *et al.*, 2008). O experimento é mostrado na Figura 30. Interessantemente, a inserção da agulha resultou na redução da tensão mínima para 800 V, um decréscimo de 38,5% dos 1300 V aplicados no estudo de caso. Um problema relacionado a este arranjo é a elevada densidade de corrente na agulha central. O fluxo de corrente por um meio condutor envolve aquecimento por efeito Joule e, conseqüentemente, elevação da temperatura (PLIQUETT, 2003). Para temperaturas acima de 40-45 °C se observa desnaturação de proteínas e dano às estruturas celulares que, eventualmente, resulta em necrose celular (MAJNO; JORIS, 1995), (LACKOVIC; MAGJAREVIC; MIKLAVCIC, 2009), (CHU; DUPUY, 2014). Segundo Jahangeer (2013), a inflamação e necrose, como conseqüências de danos por ablação térmica (*e.g.* ARF) dificultam acompanhamento através de exames por imagens no pós-operatório. Há dificuldade em identificar resíduos e recorrências em imagens radiológicas devido à inflamação e cicatrização (JAHANGEER *et al.*, 2013). Isto é especialmente importante uma vez que se tem discutido uma possível relação entre inflamação e recorrência de tumores (WING *et al.*, 1988), (DONG *et al.*, 2003), (CHU; DUPUY, 2014) e (CHEN *et al.*, 2015).

Outra solução para eletrodos hexagonais é a utilização de sistemas comutados (REBERSEK *et al.*, 2008) e (REBERSEK *et al.*, 2014). Eletrodos comutados possuem diferentes estados para polarização de suas agulhas. Este tipo de sistema requer uma eletrônica mais sofisticada, contudo, pode permitir maior abrangência total de campo elétrico.

Por fim, na seção 4.9 foram apresentados eletrodos em forma de matrizes de agulhas. O objetivo destes experimentos era buscar arranjos com maior abrangência (RAMIREZ *et al.*, 1998) e (MIKLAVCIC *et al.*, 2006b). Os eletrodos normalmente utilizados, e aqui já analisados, são limitados em tamanho. Eletrodos tipo I, II ou III normalmente não tem mais de 1 cm entre polos. As matrizes são a simples expansão dos eletrodos tipo II, justapondo algumas fileiras de agulhas. Esta proposição foi avaliada e podemos observá-la na Figura 31. A polarização apresentada na Figura 31B pode ser vista como a justaposição de eletrodos tipo II. O resultado visto na Figura 31D demonstra uma distribuição potencialmente problemática. É possível observar pontos escuros no meio da distribuição. Nestes experimentos foram aplicados 1500 V, sem ser possível cobrir completamente toda a região entre agulhas. Na Figura 31 há ainda os painéis C e E sobre polarização cruzada, na qual cada agulha era rodeada por agulhas com polaridade oposta. Os resultados permitem concluir que ambas as

configurações são ineficazes para o tratamento por EQT. Em contraste a esta conclusão, alguns trabalhos tem proposto eletrodos de matriz como uma opção adequada para o tratamento de grandes tumores (CASTIELLO *et al.*, 2014) e (ONGARO *et al.*, 2015). Nestes trabalhos, são apresentados experimentos *in vitro* e *in silico*, ainda que simulações tenham sido apresentadas parcialmente. É possível que a aplicação do campo em tecidos biológicos possa desenvolver um comportamento sutil não descrito pelo modelo que utilizamos. Portanto, mais estudos poderiam ser feitos a fim de avaliar diferenças entre o modelo numérico e as observações *in vitro*. Por outro lado, na Figura 32 é apresentada uma variação do eletrodo anterior. As agulhas centrais foram retiradas, pois, mesmo sem polaridade imposta, por serem de cobre, distorciam o campo em seus arredores. Para este eletrodo, com agulhas formando um retângulo, obtivemos tensão mínima de 1100 V, similar ao estudo de caso. Contudo, a área central capaz de tratar um tumor é maior que para o eletrodo N3. Em conclusão, nossos resultados não nos permitem concluir que eletrodos de matrizes são efetivos para o tratamento por EQT, todavia, acreditamos que unir este arranjo de agulhas a sistemas de comutação da polaridade poderia ter bons resultados.

## 6 CONCLUSÃO

O eletrodo da Figura 22B drena menos corrente que o eletrodo de placas. Logo, é menos provável que induza quedas de tensão por incapacidade da fonte de alimentação. Além disto, este eletrodo permitiu uma redução da tensão mínima de 30%, não muito distante dos 40% obtidos pelo eletrodo de placas, e muito melhor que os 15% do eletrodo de agulhas usual.

Eletrodos de matriz é uma opção para resolver problema de tratar grandes tumores com eletrodos pequenos. Todavia, baseado em resultados de nossas simulações, não podemos afirmar que polarização estática permite tratamento de tumor através da EQT. É possível que unir esta configuração de agulhas em matriz ao sistema de comutação de polaridade permita uma distribuição ampla e homogênea de campo elétrico.

O presente trabalho foi baseado num estudo de caso, o que, a princípio, parece difícil de poder ser generalizado. Por conseguinte, a exaustiva lista de modificações nas características do experimento foi realizada. Alterações na polaridade das agulhas, tipos e posicionamentos dos eletrodos e dimensões do próprio nódulo tumoral permitiram uma maior compreensão do fenômeno estudado. Graças à possibilidade de realizar diversas simulações, testar inúmeras hipóteses e remodelar todo o sistema estudado, experimentos *in silico* são uma ferramenta valiosa. A resolução dos modelos numéricos agrega um nível matemático e visual de confiança ao planejamento cirúrgico, e também reduz o número animais utilizados em certos experimentos possibilitando a exaustão de algumas hipóteses antes de estudos *in vivo*.

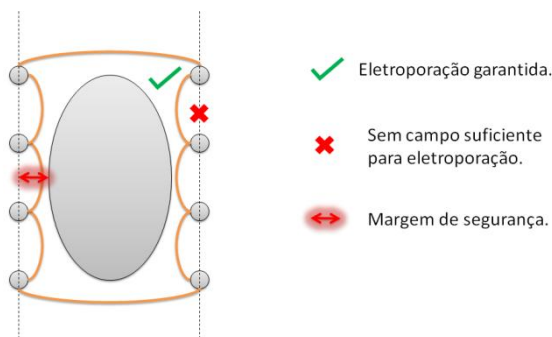


Figura 33 - Resumo da conclusão. A margem de segurança depende tanto da geometria do eletrodo, quanto dos pulsos de tensão e características dos tecidos envolvidos.



## 7 TRABALHOS FUTUROS

Os diversos tecidos animais tem um comportamento que altera, às vezes, substancialmente a condutividade dos mesmos. Conhecer o nível de alteração na condutividade de cada tecido continua sendo uma atividade que requer investimento para que, cada vez mais, modelos *in silico* sejam fidedignos. Uma continuidade disto está sendo feito, com a preparação do artigo sobre EQT em mucosa oral canina.

Ainda sobre tecidos animais, a observação da eletroporação é restrita a inserção de substâncias fluorescentes visíveis em microscópios ou medição elétrica da alteração na relação tensão/corrente. A utilização de tecidos vegetais, como batata, é uma opção para acompanhar visualmente o alcance da eletroporação, sendo uma simulação *in vitro*. Neste sentido, o grupo segue trabalhando na padronização de protocolos e de experimentação de diferentes tipos de eletrodos.

A busca contínua por eletrodos com maior abrangência para tratamento por EQT abre espaço para avaliar o desenvolvimento de um sistema comutado com os eletrodos de matriz. A comutação é importante para evitar os pontos “cegos” (sem campo) entre os eletrodos de mesma polaridade.

Além disto, grandes tumores continuam tendo prognósticos inferiores aos obtidos para pequenos tumores. Mesmo com curta abrangência dos eletrodos atuais, o princípio de funcionamento da EQT não deveria ser alterado com a realização de múltiplas aplicações, ou repetidas sessões. Assim sendo, é possível que a complexidade da distribuição de campo internamente ao tumor esteja sendo subestimada. Mais estudos *in silico* e *in vitro* (com batata) podem ser feitos para replicar os casos clínicos, buscando aprimoramentos.





## CAPÍTULO II

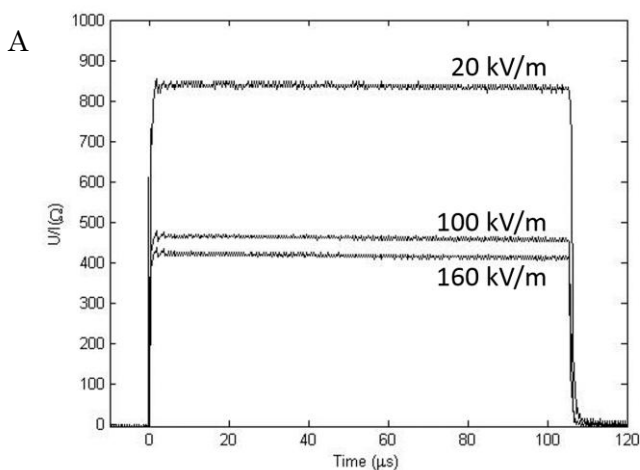
*“It doesn't matter how beautiful your theory is, it doesn't matter how smart you are. If it doesn't agree with experiment, it's wrong”.*

Richard P. Feynman



## 1 RESULTADOS

Na Figura 34A é mostrado aumento da condutividade com o aumento do campo elétrico aplicado sobre o tecido. Porém, esta dependência entre intensidade do campo aplicado e resistência elétrica da mucosa oral não é linear. Para pequenos valores de campo elétrico, 20 kV/m, a resistência não se altera com variações na amplitude da tensão. Todavia, acima do limiar de reversibilidade, o aumento na corrente não é linearmente proporcional à tensão aplicada.



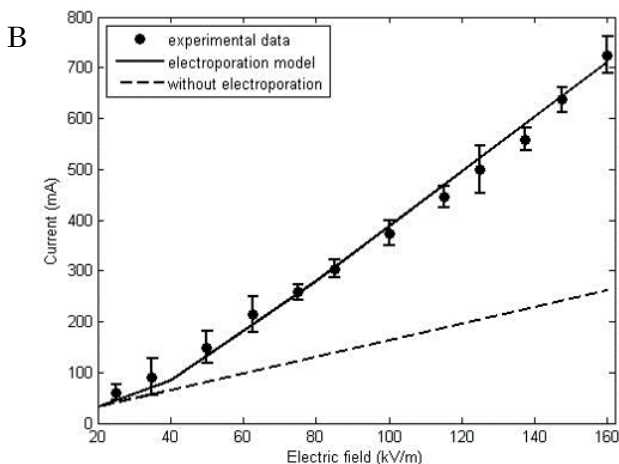


Figura 34 - Potencial e corrente elétrica medidos durante o último pulso de tensão para 20, 100 e 160 kV/m (A) e, em (B), comparação entre medições *ex vivo* e modelo *in silico* (linha sólida). Pontos e barras representam a média e desvio padrão para quatro experimentos. Linha tracejada representa simulação considerando condutividade constante, 0,23 S/m (GABRIEL; LAU; GABRIEL, 1996b). FONTE: (Suzuki *et al*, 2016b).

A Figura 34B mostra a diferença entre o modelo de tecido considerando condutividade constante (linha tracejada) e o modelo de eletroporação (linha contínua). Os valores estimados para o modelo, como base nos experimentos *ex vivo*, são  $\sigma_0 = 0,23$  S/m (GABRIEL; LAU; GABRIEL, 1996b),  $\sigma_{M\acute{A}X} = 0,8$  S/m,  $E_{REV} = 20$  kV/m e  $E_{IRREV} = 80$  kV/m.

O modelo na Figura 35A-D considerou 2,5 mm de osso abaixo da camada de mucosa oral. No modelo da Figura 35E-H foi utilizado apenas os tecidos de tumor e mucosa oral. Estes dois modelos formam a constituição anatômica da boca (SONG *et al.*, 2008) e (HOURFAR *et al.*, 2015). Duas configurações para os eletrodos são possíveis para cobrir o volume tumoral com campo elétrico suficiente. As posições dos eletrodos são no meio do tumor e na lateral do mesmo. Na região abaixo do tumor, a distribuição de campo se desenvolve diferentemente para cada uma das configurações.

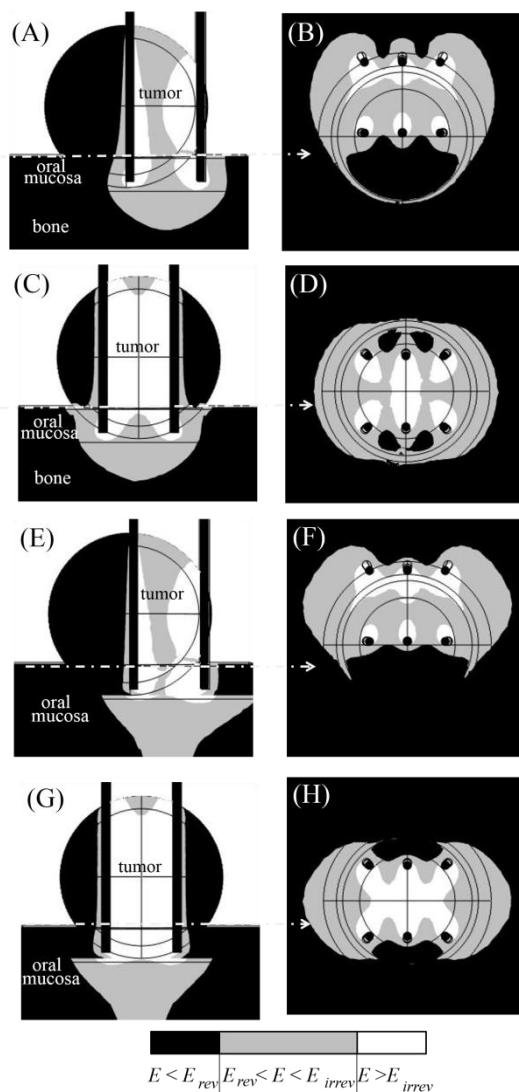


Figura 35 - Cálculo da distribuição de campo para 1300 V/cm com modelo de eletroporação em duas diferentes posições para o eletrodo durante o tratamento. Os painéis da esquerda mostram corte no plano YZ, enquanto os da direita mostram corte em XY. (A-D)

Resultados para simulação com osso abaixo da mucosa oral. (E-H) Apenas mucosa oral

FONTE: (Suzuki *et al.*, 2016b).

As limitações de espaço da cavidade oral, e a posição e o tamanho do tumor podem produzir erros durante a inserção das agulhas

do eletrodo. Na simulação apresentada na Figura 36, os eletrodos não foram inseridos na mucosa, tendo as agulhas sido inseridas apenas no tumor superficial. A posição do eletrodo em relação ao tumor apresenta uma situação na qual o tratamento por EQT não é efetivo, Figura 36C-D.

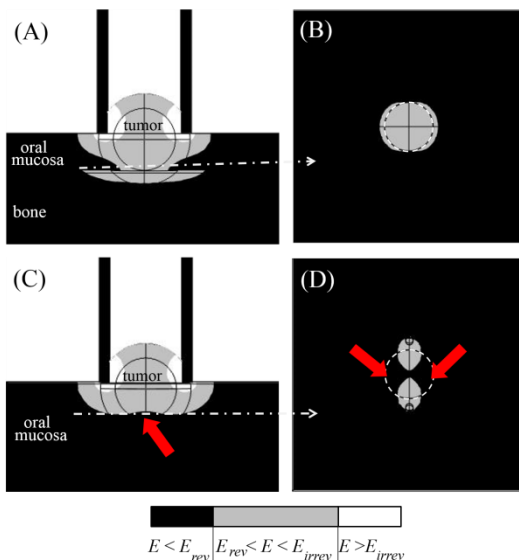


Figura 36 - Distribuição do campo elétrico para eletrodo de agulhas inserido no tumor. Painéis da esquerda mostram corte no plano YZ e, painéis da direita mostram plano XY com linha tracejada branca indicando as bordas do tumor. (A e B) Resultado para simulação com osso abaixo da mucosa oral. (C e D) Apenas mucosa. As setas indicam área do tumor que não será eliminada pela EQT.

## 2 DISCUSSÃO

A condutividade elétrica da mucosa oral não permeabilizada é compatível com resultados experimentais (LACKOVIC; STARE, 2007). A condutividade do tecido aumenta com a eletropermeabilização,  $\sigma_{MÁX}/\sigma_0 = 3,5$ . Este valor é compatível com resultados experimentais de eletroporação em músculo (2,5-5 (IVORRA *et al.*, 2008) e (COROVIC *et al.*, 2013b)), tecidos conectivos (3 (PAVSELJ *et al.*, 2005)), e derme (4 (COROVIC *et al.*, 2013b)). Os valores dos limiares de campo elétrico ( $E_{REV} = 20$  kV/m e  $E_{IRREV} = 80$  kV/m) são similares ao modelo de eletroporação em músculo (PAVSELJ *et al.*, 2005) e (IVORRA *et al.*, 2008). A área reversivelmente permeabilizada foi assumida pelo efeito da bleomicina na morte do tumor *in vivo*. O modelo de eletroporação para mucosa oral e tumor na Figura 35 é compatível com resultados *in vivo* na Figura 7C-D. É observável área de eletroporação irreversível na simulação, todavia, tal situação não foi observada no tratamento *in vivo* por EQT. Assume-se que a dinâmica do processo de distribuição de campo em tecido mude rapidamente na região entre os eletrodos, embora o tempo destas alterações ainda não esteja claro (MIKLAVCIC *et al.*, 2004) e (PAVSELJ *et al.*, 2005), mas é possível que o campo elétrico local não permaneça acima do limiar de irreversibilidade tempo suficiente para provocar danos ao tecido.

A condutividade elétrica do palato duro (LACKOVIC; STARE, 2007) e dos ossos (GABRIEL; LAU; GABRIEL, 1996b) é similar, e a distribuição de campo nestes tecidos é a mesma. Porém, a permissividade elétrica do palato duro é de 10 a 100 vezes maior que dos ossos. A cavidade oral apresenta espessuras variáveis para mucosa oral, palato duro e ossos (SONG *et al.*, 2008) e (HOURFAR *et al.*, 2015). A Figura 35 mostra o efeito do osso ou do palato duro na distribuição de campo elétrico. A EQT de tumores é efetiva tanto próxima a ossos quanto em mucosa oral espessa.

A Figura 36 apresenta um erro real na clínica veterinária. A anatomia da cavidade oral de alguns animais não permite o posicionamento adequado dos eletrodos de agulhas. Esses erros podem produzir situações similares às observadas na Figura 36C-D. Os eletrodos não estão inseridos fundo o suficiente, então o campo elétrico local não permite eletroporação de todo o volume tumoral (COROVIC *et al.*, 2008). No entanto, a distribuição de campo elétrico no tumor é afetada pela baixa condutividade elétrica do osso. Neste caso, a

distorção causada pelos ossos é boa para a EQT. O tumor é eliminado como apresentado nas Figura 36A-B.

Os ossos na cavidade oral não são planos, e em algumas regiões, existem cavidades e protuberâncias que podem provocar irregularidades na distribuição de campo elétrico. Desta maneira, é importante considerar estudos numéricos realísticos para tratamentos próximos aos ossos.



### 3 CONCLUSÃO

A dependência da condutividade elétrica da mucosa oral em função do campo elétrico local foi modelada através de modelos *ex vivo* e *in vivo*.

A aplicação deste modelo demonstra que a anatomia da cavidade oral provoca irregularidades na distribuição do campo elétrico. Este efeito ocorre, principalmente, próximo a ossos e palato duro.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APOLLONIO, F. et al. **Electroporation mechanism: Review of molecular models based on computer simulation**. 2012 6th European Conference on Antennas and Propagation (EUCAP). **Anais...IEEE**, mar. 2012Disponível em:  
<<http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=6206719>>

BARNETT, A.; WEAVER, J. C. Electroporation: A unified, quantitative theory of reversible electrical breakdown and mechanical rupture in artificial planar bilayer membranes. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 25, n. 2, p. 163–182, abr. 1991.

BAUMANN, M. et al. Radiation oncology in the era of precision medicine. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 4, p. 234–249, 18 mar. 2016.

BERKENBROCK, J. A.; RANGEL, M. M. M.; SUZUKI, D. O. H. Numerical Study for Needle Electrode in Treatment of Cutaneous Tumor Model. In: JARM, T.; KRAMAR, P. (Eds.). **1st World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies**. Portorož: Springer-Verlag Singapur, 2016. p. 433–436.

BERNIER, J.; HALL, E. J.; GIACCIA, A. Timeline: Radiation oncology: a century of achievements. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 9, p. 737–747, set. 2004.

BONAKDAR, M. et al. The Feasibility of a Smart Surgical Probe for Verification of IRE Treatments Using Electrical Impedance Spectroscopy. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 62, n. 11, p. 2674–2684, nov. 2015.

BRANDISKY, K.; DASKALOV, I. Electrical field and current distributions in electrochemotherapy. **Bioelectrochemistry and bioenergetics (Lausanne, Switzerland)**, v. 48, n. 1, p. 201–8, fev. 1999.

BYRNE, C. M. et al. Treatment of metastatic melanoma using electroporation therapy with bleomycin (electrochemotherapy). **Melanoma Research**, v. 15, n. 1, p. 45–51, fev. 2005.

CAMPANA, L. G. et al. Bleomycin-based electrochemotherapy: clinical outcome from a single institution's experience with 52 patients. **Annals of surgical oncology**, v. 16, n. 1, p. 191–9, jan. 2009.

CAMPANA, L. G. et al. Electrochemotherapy in non-melanoma head and neck cancers: a retrospective analysis of the treated cases. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 52, n. 10, p. 957–964, 1 dez. 2014.

CAMPANA, L. G. et al. Electrical resistance of human soft tissue sarcomas: an ex vivo study on surgical specimens. **Medical & Biological Engineering & Computing**, v. 54, n. 5, p. 773–787, 1 maio 2016.

CASTIELLO, M. et al. A new grid electrode for electrochemotherapy treatment of large skin tumors. **IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation**, v. 21, p. 1424–1432, 2014.

CHABNER, B. A; ROBERTS, T. G. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 1, p. 65–72, jan. 2005.

CHANG, D. C. Cell poration and cell fusion using an oscillating electric field. **Biophysical Journal**, v. 56, n. 4, p. 641–652, out. 1989.

CHEN, C. et al. Membrane electroporation theories: a review. **Medical & Biological Engineering & Computing**, v. 44, n. 1-2, p. 5–14, mar. 2006.

CHEN, X. et al. Preclinical Study of Locoregional Therapy of Hepatocellular Carcinoma by Bioelectric Ablation with Microsecond Pulsed Electric Fields ( $\mu$ sPEFs). **Scientific Reports**, v. 5, p. 9851, 30 abr. 2015.

CHOPINET, L.; ROLS, M.-P. Nanosecond electric pulses: A mini-review of the present state of the art. **Bioelectrochemistry**, v. 103, p. 2–6, jun. 2015.

CHU, K. F.; DUPUY, D. E. Thermal ablation of tumours: biological mechanisms and advances in therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 3, p. 199–208, 24 fev. 2014.

COROVIC, S. et al. Importance of contact surface between electrodes and treated tissue in electrochemotherapy. **Technology in cancer research & treatment**, v. 7, n. 5, p. 393–400, out. 2008.

COROVIC, S. et al. Modeling of electric field distribution in tissues during electroporation. **BioMedical Engineering OnLine**, v. 12, n. 1, p. 16, jan. 2013a.

COROVIC, S. et al. Modeling of electric field distribution in tissues during electroporation. **Biomedical engineering online**, v. 12, n. 1, p. 16, jan. 2013b.

COROVIC, S.; ZUPANIC, A.; MIKLAVCIC, D. Numerical Modeling and Optimization of Electric Field Distribution in Subcutaneous Tumor Treated With Electrochemotherapy Using Needle Electrodes. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v. 36, n. 4, p. 1665–1672, ago. 2008.

CROWLEY, J. M. Electrical Breakdown of Bimolecular Lipid Membranes as an Electromechanical Instability. **Biophysical Journal**, v. 13, n. 7, p. 711–724, jul. 1973.

CURATOLO, P. et al. Electrochemotherapy in the treatment of Kaposi sarcoma cutaneous lesions: a two-center prospective phase II trial. **Annals of surgical oncology**, v. 19, n. 1, p. 192–8, jan. 2012.

DATTA, A.; RAKESH, V. **An introduction to modeling of transport processes: applications to biomedical systems: Applications to Biomedical Systems**. [s.l.] Cambridge University Press, 2010.

DAVALOS, R. V.; MIR, L. M.; RUBINSKY, B. Tissue Ablation with Irreversible Electroporation. **Annals of Biomedical Engineering**, v.

33, n. 2, p. 223–231, fev. 2005.

DEBRUIN, K. A; KRASSOWSKA, W. Modeling Electroporation in a Single Cell. I. Effects of Field Strength and Rest Potential. **Biophysical Journal**, v. 77, n. 3, p. 1213–1224, set. 1999.

DENZI, A. et al. Modeling the positioning of single needle electrodes for the treatment of breast cancer in a clinical case. **BioMedical Engineering OnLine**, v. 14, n. Suppl 3, p. S1, 2015.

DI MONTA, G. et al. Electrochemotherapy as “new standard of care” treatment for cutaneous Kaposi’s sarcoma. **European journal of surgical oncology: the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology**, v. 40, n. 1, p. 61–6, jan. 2014.

DIMAIO, S. P.; SALCUDEAN, S. E. Needle insertion modeling and simulation. **IEEE Transactions on Robotics and Automation**, v. 19, n. 5, p. 864–875, out. 2003.

DIMITROV, D. S. Electric field-induced breakdown of lipid bilayers and cell membranes: A thin viscoelastic film model. **The Journal of Membrane Biology**, v. 78, n. 1, p. 53–60, fev. 1984.

DONG, B. W. et al. Sequential pathological and immunologic analysis of percutaneous microwave coagulation therapy of hepatocellular carcinoma. **Int.J Hyperthermia**, v. 19, n. 0265-6736 (Print), p. 119–133, 9 jan. 2003.

DUPUY, D. E.; ASWAD, B.; NG, T. Irreversible electroporation in a Swine lung model. **Cardiovascular and interventional radiology**, v. 34, n. 2, p. 391–5, abr. 2011.

ENGLISH, N. J.; WALDRON, C. J. Perspectives on external electric fields in molecular simulation: progress, prospects and challenges. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 17, n. 19, p. 12407–12440, 2015.

FOX, M. B. et al. Electroporation of cells in microfluidic devices: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 385, n. 3, p. 474–485, jun. 2006.

GABRIEL, B.; TEISSIÉ, J. Direct observation in the millisecond time range of fluorescent molecule asymmetrical interaction with the electroporabilized cell membrane. **Biophysical Journal**, v. 73, n. 5, p. 2630–2637, nov. 1997.

GABRIEL, S.; LAU, R. W.; GABRIEL, C. The dielectric properties of biological tissues: II. Measurements in the frequency range 10 Hz to 20 GHz. **Physics in Medicine and Biology**, v. 41, n. 11, p. 2251–2269, 1 nov. 1996a.

GABRIEL, S.; LAU, R. W.; GABRIEL, C. The dielectric properties of biological tissues: III. Parametric models for the dielectric spectrum of tissues. **Physics in Medicine and Biology**, v. 41, n. 11, p. 2271–2293, 1 nov. 1996b.

GARCIA, P. A et al. A parametric study delineating irreversible electroporation from thermal damage based on a minimally invasive intracranial procedure. **Biomedical engineering online**, v. 10, n. 1, p. 34, 2011.

GARCIA, P. A; DAVALOS, R. V; MIKLAVCIC, D. A numerical investigation of the electric and thermal cell kill distributions in electroporation-based therapies in tissue. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e103083, jan. 2014.

GEHL, J. et al. In vivo electroporation of skeletal muscle: threshold, efficacy and relation to electric field distribution. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1428, n. 2-3, p. 233–240, ago. 1999.

GIARDINO, R. et al. Electrochemotherapy a novel approach to the treatment of metastatic nodules on the skin and subcutaneous tissues. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie**, v. 60, n. 8, p. 458–62, set. 2006.

GILBERT, R. A.; JAROSZESKI, M. J.; HELLER, R. Novel electrode designs for electrochemotherapy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1334, n. 1, p. 9–14, fev. 1997.

GOLBERG, A. et al. Eradication of multidrug-resistant *A. baumannii* in burn wounds by antiseptic pulsed electric field. **Technology**, v. 2, n. 2, p. 153–160, 2014.

GOLZIO, M.; TEISSIÉ, J. Direct assay of electroporomeabilization in a 2D pseudo tissue. **Physical chemistry chemical physics : PCCP**, v. 12, n. 44, p. 14670–14672, 2010.

GOWRISHANKAR, T. R.; WEAVER, J. C. An approach to electrical modeling of single and multiple cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 6, p. 3203–8, 18 mar. 2003.

GROSELJ, A. et al. Coupling treatment planning with navigation system: a new technological approach in treatment of head and neck tumors by electrochemotherapy. **BioMedical Engineering OnLine**, v. 14, n. Suppl 3, p. S2, 2015.

HELLER, R.; GILBERT, R.; JAROSZESKI, M. J. Clinical applications of electrochemotherapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 35, n. 1, p. 119–129, jan. 1999.

HOURLFAR, J. et al. Three dimensional anatomical exploration of the anterior hard palate at the level of the third ruga for the placement of mini-implants - a cone-beam CT study. **The European Journal of Orthodontics**, n. 4, p. 1–7, 6 jan. 2015.

IVORRA, A. et al. Use of conductive gels for electric field homogenization increases the antitumor efficacy of electroporation therapies. **Physics in medicine and biology**, v. 53, n. 22, p. 6605–18, 21 nov. 2008.

IVORRA, A. et al. In vivo electrical conductivity measurements during and after tumor electroporation: conductivity changes reflect the treatment outcome. **Physics in medicine and biology**, v. 54, n. 19, p. 5949–5963, 2009.

JAHANGEER, S. et al. Review of current thermal ablation treatment for lung cancer and the potential of electrochemotherapy as a means for treatment of lung tumours. **Cancer Treatment Reviews**, v. 39, n. 8, p. 862–871, dez. 2013.

JIANG, C.; DAVALOS, R. V.; BISCHOF, J. C. A Review of Basic to Clinical Studies of Irreversible Electroporation Therapy. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 62, n. 1, p. 4–20, jan. 2015.

KINOSITA, K. et al. Electroporation of cell membrane visualized under a pulsed-laser fluorescence microscope. **Biophysical Journal**, v. 53, n. 6, p. 1015–1019, jun. 1988.

KINOSITA, K.; TSONG, T. Y. Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane. **Nature**, v. 268, n. 5619, p. 438–441, 4 ago. 1977.

KOTNIK, T. et al. Electroporation-based applications in biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 8, 2015.

KOTNIK, T.; MIKLAVČIČ, D.; SLIVNIK, T. Time course of transmembrane voltage induced by time-varying electric fields—a method for theoretical analysis and its application. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, n. 1, p. 3–16, mar. 1998.

LACKOVIC, I.; MAGJAREVIC, R.; MIKLAVCIC, D. Three-dimensional finite-element analysis of joule heating in electrochemotherapy and in vivo gene electrotransfer. **IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation**, v. 16, n. 5, p. 1338–1347, out. 2009.

LACKOVIĆ, I.; MAGJAREVIĆ, R.; MIKLAVČIČ, D. Incorporating Electroporation-related Conductivity Changes into Models for the Calculation of the Electric Field Distribution in Tissue. In: **XII Mediterranean Conference on Medical and Biological Engineering and Computing 2010**. [s.l.: s.n.]. p. 695–698.

LACKOVIC, I.; STARE, Z. Low-frequency dielectric properties of the oral mucosa. In: **13th International Conference on Electrical Bioimpedance and the 8th Conference on Electrical Impedance Tomography**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 154–157.

LARKIN, J. O. et al. Electrochemotherapy. **Annals of Surgery**, v. 245, n. 3, p. 469–479, mar. 2007.

LEGUÈBE, M. et al. Conducting and permeable states of cell membrane submitted to high voltage pulses: Mathematical and numerical studies validated by the experiments. **Journal of Theoretical Biology**, v. 360, p. 83–94, nov. 2014.

LITSTER, J. D. Stability of lipid bilayers and red blood cell membranes. **Physics Letters A**, v. 53, n. 3, p. 193–194, jun. 1975.

LOWE, S. W.; CEPERO, E.; EVAN, G. Intrinsic tumour suppression. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 307–315, 18 nov. 2004.

MAHNIČ-KALAMIZA, S.; VOROBIEV, E.; MIKLAVČIČ, D. Electroporation in Food Processing and Biorefinery. **The Journal of Membrane Biology**, v. 247, n. 12, p. 1279–1304, dez. 2014.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **The American journal of pathology**, v. 146, n. 1, p. 3–15, jan. 1995.

MALI, B. et al. Tumor size and effectiveness of electrochemotherapy. **Radiology and oncology**, v. 47, n. 1, p. 32–41, mar. 2013.

MALI, B. et al. Electrochemotherapy of colorectal liver metastases - an observational study of its effects on the electrocardiogram. **BioMedical Engineering OnLine**, v. 14, n. Suppl 3, p. S5, 2015.

MARTY, M. et al. Electrochemotherapy - An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. **European Journal of Cancer, Supplement**, v. 4, n. 11, p. 3–13, 2006.

MATTHIESSEN, L. W. et al. Electrochemotherapy for large cutaneous recurrence of breast cancer: A phase II clinical trial. **Acta Oncologica**, v. 51, n. 6, p. 713–721, 26 jul. 2012.

MEIR, A.; RUBINSKY, B. Electrical Impedance Tomography of Electrolysis. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. 16, 3 jun. 2015.

MIKLAVCIC, D. et al. **Sequential Finite Element Model of Tissue Electroporpermabilisation**. The 26th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. **Anais...IEEE**, jan. 2004Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17271057>>

MIKLAVCIC, D. et al. Importance of tumour coverage by sufficiently high local electric field for effective electrochemotherapy. v. 4, p. 0–6, 2006a.

MIKLAVCIC, D. et al. Importance of tumour coverage by sufficiently high local electric field for effective electrochemotherapy. **European Journal of Cancer Supplements**, v. 4, n. 11, p. 45–51, nov. 2006b.

MIKLAVCIC, D. et al. Towards treatment planning and treatment of deep-seated solid tumors by electrochemotherapy. **Biomedical engineering online**, v. 9, p. 10, jan. 2010.

MIR, L. M. et al. Electrochemotherapy potentiation of antitumour effect of bleomycin by local electric pulses. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology**, v. 27, n. 1, p. 68–72, jan. 1991.



MIR, L. M. Review article Therapeutic perspectives of in vivo cell electroporabilization q. **Bioelectrochemistry**, v. 53, n. 1, p. 1–10, 2000.

MIR, L. M. et al. Standard operating procedures of the electrochemotherapy: Instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the Cliniporator<sup>TM</sup> by means of invasive or non-invasive electrodes. **European Journal of Cancer Supplements**, v. 4, n. 11, p. 14–25, nov. 2006.

MIR, L. M.; BANOUN, H.; PAOLETTI, C. Introduction of definite amounts of nonpermeant molecules into living cells after electroporabilization: Direct access to the cytosol. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 15–25, mar. 1988.

NEAL, R. E. et al. Experimental Characterization and Numerical Modeling of Tissue Electrical Conductivity during Pulsed Electric Fields for Irreversible Electroporation Treatment Planning. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 59, n. 4, p. 1076–1085, abr. 2012.

NEU, J. C.; KRASSOWSKA, W. Asymptotic model of electroporation. **Physical Review E**, v. 59, n. 3, p. 3471–3482, 1 mar. 1999.

NEUMANN, E. et al. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. **The EMBO journal**, v. 1, n. 7, p. 841–845, 1982.

NEVES, G. G. et al. **ESTUDO NUMÉRICO DA ELETROQUIMIOTERAPIA EM TUMOR CUTÂNEO COM ELETRODOS DE PLACAS E AGULHAS**. XXIV CBEB - Edição 2014. **Anais...2014** Disponível em: <[http://www.canal6.com.br/cbeb/2014/artigos/cbeb2014\\_submission\\_350.pdf](http://www.canal6.com.br/cbeb/2014/artigos/cbeb2014_submission_350.pdf)>

OLAIZ, N. et al. Tissue damage modeling in gene electrotransfer: The role of pH. **Bioelectrochemistry**, v. 100, p. 105–111, dez. 2014.

ONGARO, A. et al. Evaluation of the Electroporation Efficiency of a Grid Electrode for Electrochemotherapy: From Numerical Model to In Vitro Tests. **Technology in Cancer Research & Treatment**, 24 abr. 2015.

ORLOWSKI, S. et al. Transient electroporabilization of cells in culture. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, n. 24, p. 4727–4733, dez. 1988.

PAGANIN-GIOANNI, A. et al. Direct visualization at the single-cell level of siRNA electrotransfer into cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 26, p. 10443–10447, 28 jun. 2011.

PARKIN, J.; CHAVENT, M.; KHALID, S. Molecular Simulations of Gram-Negative Bacterial Membranes: A Vignette of Some Recent Successes. **Biophysical Journal**, v. 109, n. 3, p. 461–468, ago. 2015.

PAVSELJ, N. et al. The Course of Tissue Permeabilization Studied on a Mathematical Model of a Subcutaneous Tumor in Small Animals.

**IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 52, n. 8, p. 1373–1381, ago. 2005.

PLIQUETT, U. Joule heating during solid tissue electroporation. **Medical & Biological Engineering & Computing**, v. 41, n. 2, p. 215–219, mar. 2003.

PUC, M. et al. Techniques of signal generation required for electroporpermabilization. **Bioelectrochemistry**, v. 64, n. 2, p. 113–124, set. 2004.

PUCIHAR, G.; MIR, L. .; MIKLAVČIČ, D. The effect of pulse repetition frequency on the uptake into electroporpermabilized cells in vitro with possible applications in electrochemotherapy. **Bioelectrochemistry**, v. 57, n. 2, p. 167–172, set. 2002.

QUAGLINO, P. et al. Electrochemotherapy with intravenous bleomycin in the local treatment of skin melanoma metastases. **Annals of surgical oncology**, v. 15, n. 8, p. 2215–22, ago. 2008.

QUEIROLO, P.; MARINCOLA, F.; SPAGNOLO, F. Electrochemotherapy for the management of melanoma skin metastasis: a review of the literature and possible combinations with immunotherapy. **Archives of Dermatological Research**, v. 306, n. 6, p. 521–526, 30 ago. 2014.

RAMIREZ, L. H. et al. Electrochemotherapy on liver tumours in rabbits. **British journal of cancer**, v. 77, n. 12, p. 2104–11, jun. 1998.

RAMOS, A. Effect of the Electroporation in the Field Calculation in Biological Tissues. **Artificial Organs**, v. 29, n. 6, p. 510–513, jun. 2005.

RAMOS, A.; SUZUKI, D. O. H.; MARQUES, J. L. B. Numerical Simulation of Electroporation in Spherical Cells. **Artificial Organs**, v. 28, n. 4, p. 357–361, abr. 2004.

REBERSEK, M. et al. Electrode commutation sequence for honeycomb arrangement of electrodes in electrochemotherapy and corresponding electric field distribution. **Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)**, v. 74, n. 1, p. 26–31, nov. 2008.

REBERŠEK, M. et al. Cell membrane electroporation-Part 3: The equipment. **IEEE Electrical Insulation Magazine**, v. 30, n. 3, p. 8–18, 2014.

REMS, L. et al. Properties of lipid electropores II: Comparison of continuum-level modeling of pore conductance to molecular dynamics simulations. **Bioelectrochemistry**, abr. 2016.

SALE, A.; HAMILTON, W. Effects of high electric fields on microorganismsI. Killing of bacteria and yeasts. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 148, n. 3, p. 781–788, 27 dez. 1967.

SEL, D. et al. Finite-element modeling of needle electrodes in tissue from the perspective of frequent model computation. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 50, n. 11, p. 1221–1232, nov. 2003.

SERSA, G.; CEMAZAR, M. Electrochemotherapy: advantages and drawbacks in treatment of cancer patients. **Cancer Therapy**, v. 1, p. 133–142, 2003.

SHIRZADI, Z.; SADEGHI-NAINI, A.; SAMANI, A. Toward in vivo lung's tissue incompressibility characterization for tumor motion modeling in radiation therapy. **Medical Physics**, v. 40, n. 5, p. 051902, 2013.

SILVE, A. et al. Impact of external medium conductivity on cell membrane electroporation by microsecond and nanosecond electric pulses. **Scientific Reports**, v. 6, n. November 2015, p. 19957, 1 fev. 2016.

SON, R. S. et al. Basic Features of a Cell Electroporation Model: Illustrative Behavior for Two Very Different Pulses. **The Journal of Membrane Biology**, v. 247, n. 12, p. 1209–1228, dez. 2014.

SONG, J.-E. et al. Thickness of Posterior Palatal Masticatory Mucosa: The Use of Computerized Tomography. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 3, p. 406–412, mar. 2008.

SPUGNINI, E. P. et al. Electrochemotherapy with cisplatin enhances local control after surgical ablation of fibrosarcoma in cats: an approach to improve the therapeutic index of highly toxic chemotherapy drugs. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, n. 1, p. 152, 30 dez. 2011.

STAMPFLI, R. Reversible electrical breakdown of the excitable membrane of a Ranvier node. **Anais Academia Brasileira de Ciências**, v. 30, p. 57–63, 1957.

STEWART, B.; WILD, C. P. (EDS.). **World Cancer Report 2014**. [s.l.] WHO, 2015.

SUÁREZ, C. et al. The Role of Additional Pulses in Electroporation Protocols. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. e113413, 2014.

SUGÁR, I. P. A theory of the electric field-induced phase transition of phospholipid bilayers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 556, n. 1, p. 72–85, set. 1979.

SUROWIEC, A.; STUCHLY, S. S.; SWARUP, A. Radiofrequency dielectric properties of animal tissues as a function of time following death. **Physics in Medicine and Biology**, v. 30, n. 10, p. 1131–1141, 1 out. 1985.

SUZUKI, D. O. H. et al. Theoretical and experimental analysis of electroporated membrane conductance in cell suspension. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 58, n. 12 PART 1, p. 3310–3318, 2011.

SUZUKI, D. O. H. et al. Numerical Model of Dog Mast Cell Tumor Treated by Electrochemotherapy. **Artificial Organs**, v. 39, n. 2, p. 192–197, 9 fev. 2015.

SUZUKI, D. O. H.; MARQUES, C. M. G.; RANGEL, M. M. M. Conductive Gel Increases the Small Tumor Treatment With

Electrochemotherapy Using Needle Electrodes. **Artificial organs**, p. n/a–n/a, 3 nov. 2015.

TAREK, M. Membrane Electroporation: A Molecular Dynamics Simulation. **Biophysical Journal**, v. 88, n. 6, p. 4045–4053, jun. 2005.

TAUPIN, C.; DVOLAITZKY, M.; SAUTEREY, C. Osmotic pressure induced pores in phospholipid vesicles. **Biochemistry**, v. 14, n. 21, p. 4771–4775, 1975.

TEISSIE, J.; TSONG, T. Y. Electric field induced transient pores in phospholipid bilayer vesicles. **Biochemistry**, v. 20, n. 6, p. 1548–1554, 1981.

TOEPFL, S.; HEINZ, V.; KNORR, D. High intensity pulsed electric fields applied for food preservation. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 46, n. 6, p. 537–546, jun. 2007.

TRAINITO, C. I.; FRANÇAIS, O.; LE PIOUFLE, B. Analysis of pulsed electric field effects on cellular tissue with Cole–Cole model: Monitoring permeabilization under inhomogeneous electrical field with bioimpedance parameter variations. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 29, p. 193–200, maio 2015.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Cancer genes and the pathways they control. **Nature Medicine**, v. 10, n. 8, p. 789–799, ago. 2004.

WEAVER, J. C. Electroporation: a general phenomenon for manipulating cells and tissues. **Journal of cellular biochemistry**, v. 51, n. 4, p. 426–35, 1993.

WEAVER, J. C. et al. A brief overview of electroporation pulse strength–duration space: A region where additional intracellular effects are expected. **Bioelectrochemistry**, v. 87, p. 236–243, out. 2012.

WEAVER, J. C.; CHIZMADZHEV, Y. A. Theory of electroporation: A review. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 41, n. 2, p. 135–160, dez. 1996.

WING, M. et al. Characterisation of suppressor cells generated following cryosurgery of an HSV-2-induced fibrosarcoma. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 26, n. 2, p. 169–75, abr. 1988.

ŽUPANIČ, A.; ČOROVIĆ, S.; MIKLAVČIČ, D. Optimization of electrode position and electric pulse amplitude in electrochemotherapy. **Radiology and Oncology**, v. 42, n. 2, p. 93–101, 2008.

ZUPANIC, A.; KOS, B.; MIKLAVCIC, D. Treatment planning of electroporation-based medical interventions: electrochemotherapy, gene electrotransfer and irreversible electroporation. **Physics in Medicine and Biology**, v. 57, n. 17, p. 5425–5440, 7 set. 2012.

## ANEXOS

## ANEXO A

<i><b>Tipos de câncer</b></i>	<i><b>Principais locais de metástase*</b></i>
Bexiga	Ossos, fígado e pulmão
Mama	Ossos, cérebro, fígado e pulmão
Colorectal	Fígado, pulmão e peritônio
Rim	Glândula adrenal, ossos, cérebro, fígado e pulmão
Pulmão	Glândula adrenal, ossos, cérebro, fígado e outro pulmão
Melanoma	Ossos, cérebro, fígado, pulmão e pele/músculo
Ovário	Fígado, pulmão e peritônio
Pâncreas	Fígado, pulmão e peritônio
Próstata	Glândula adrenal, ossos, fígado e pulmão
Estômago	Fígado, pulmão e peritônio
Tireoide	Ossos, fígado e pulmão
Útero	Ossos, fígado, pulmão, peritônio e vagina

\*Em ordem alfabética. Cérebro inclui o tecido neural do cérebro (parênquima) e as leptomeninges (as duas membranas mais internas – araquenoide e pia mater – das três membranas conhecidas como as meninges que recobrem o cérebro e a medula espinal; O espaço entre araquenoide e pia mater contendo o fluido cerebroespinal). Pulmão inclui a principal porção do órgão (parênquima) assim como a pleura (membrana que cobre os pulmões).

FONTE: National Cancer Institute. Metastatic Cancer. <<http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer/metastatic-fact-sheet>>. Acessado em 09/04/2016.